

**Zur Funktion des Wasserleitungssystems und  
der Entwicklung von Knospen in Schwämmen.  
Morphologische Grundlagen einer reversen Genetik.**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. Biol. (t.o.) Jörg Ulrich Hammel  
geboren am 29. März 1980 in Backnang

Hauptberichter: PD Dr. Michael Nickel (Friedrich-Schiller-Universität Jena)  
1. Mitberichter: Prof. Dr. Lennart Olsson (Friedrich-Schiller-Universität Jena)  
2. Mitberichter: Prof. Dr. Gert Wörheide (Ludwig-Maximilians-Universität München)

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 2010

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Die vorliegende Dissertationsschrift wurde von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt.

Ich erkläre außerdem, dass ich bisher keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe. Weder diese noch eine andere Dissertation wurde im In- oder Ausland einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jena, 10. Juni 2010

Dipl. Biol. (t.o.) Jörg U. Hammel





## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

**PD. Dr. Michael Nickel** danke ich herzlich für die Überlassung und Betreuung des Themas und seine fortwährende ideelle und finanzielle Unterstützung der Arbeit. Er hatte nicht nur immer ein offenes Ohr und Zeit für fachliche Diskussionen, sondern auch die allgemeinen Probleme des Laboralltags und darüber hinaus. Mit seiner Erfahrung war er mir ein Mentor in allen Bereichen des wissenschaftlichen Arbeitens.

Für die unkomplizierte anhaltende Unterstützung der Arbeit durch Herrn **Prof. Dr. Martin S. Fischer** nach meinem Wechsel an sein Institut bin ich sehr dankbar. Probleme gab es für ihn keine – nur Lösungen. Sein stetiger und unermüdlicher Tatendrang waren mir ein Vorbild und Motivation für die Arbeit.

Auch meine ehemaligen Stuttgarter Kollegen möchte ich an dieser Stelle nicht vergessen. **Prof. Dr. Hans-Dieter Görtz**, der die Arbeit von Anfang an unterstützte und **Dr. Michael Schweikert**, der mir bei der Anfertigung von SR- $\mu$ CT-Proben mit seiner Erfahrung aus der Mikroskopie zur Seite stand.

**PD Dr. Hans Pohl** und **Dr. Frank Friedrich** danke ich für ihre geduldige Einweisung in die Rasterelektronenmikroskopie und ihre Unterstützung bei den immer wieder auftretenden Problemen und Fragen.

**Dr. Heiko Stark** war eine große Hilfe bei der Anfertigung der elektrischen Bauteile für spezialisierte Versuchsaufbauten und hatte immer ein offenes Ohr bei Fragen und Problemen die Programmierung oder Computerhardware betreffend.

Für ihre Unterstützung bei der Anfertigung histologischer und rasterelektronenmikroskopischer Proben, sowie bei vielen Laborarbeiten danke ich **Katja Felbel** vielmals. **Ingrid Weiß**, **Rommy Petersohn** und **Benjamin Weiss** waren immer zur Stelle wenn ich wieder einmal auf der Suche nach speziellen Chemikalien und Gerätschaften war. **Thomas Blochberger** danke ich herzlich für die Anfertigung von speziellen Laboraufbauten.

Den folgenden Personen danke ich für den Zugang zu speziellen Laborgerätschaften, oder für das Aushelfen mit Chemikalien und Reagenzien: **Prof. Dr. Lennart Olsson**, **Prof. Dr. Steffen Harzsch**, **PD Dr. Reinhard Predel** sowie **Katrin Streitberger** und **Kerstin Hoffmann**.

Meinen Kooperationspartnern **Dr. Felix Beckmann** und **Dr. Julia Herzen** vom GKSS-Forschungszentrum danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Anfertigung der SR- $\mu$ CT-Aufnahmen. Ihr Bemühen das Beste aus den Proben heraus zu holen hat wesentlich zum erfolgreichen Gelingen der Arbeit beigetragen. **Prof. Dr. Dennis Lavrov** und **Karri Haen** danke ich für die Anfertigung und Überlassung des in der Arbeit eingesetzten Expressionsplasmids. **Dr. Jaap Kaandorp** und **Max Filatov** bin ich für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei der quantitativen Analyse der Wasserleitungssysteme von Schwämmen zu Dank verpflichtet. Für die Überlassung von Sequenzdaten aus unterschiedlichen Schwämmen danke ich **Prof. Dr. Gert Wörheide** herzlich.

**Patrick Baum** war mir eine große Hilfe bei der Planung und Auswertung der RNA-Interferenz-Experimente. Geduldig beantwortete er all meine Nachfragen und half mir Lösungen für die immer wieder auftretenden Probleme zu finden.

**Dr. Michael Friedrich** und der Firma PeqLab danke ich für ihre Unterstützung von molekulargenetischen Arbeiten in den Experimenten zur RNA-Interferenz.

Bei mathematischen Fragen und deren Umsetzung in MatLab waren mir **Bernd Stritzelberger** und **Bianka Schneider** eine große Hilfe. Geduldig versuchten sie mit mir für jedes Problem eine Lösung zu finden und mir diese verständlich zu machen.

**Isabel Koch** (Wilhelma Stuttgart) war zur Stelle wenn einmal aufgrund von Problemen mit dem Aquarium Nachschub an neuem Schwammmaterial von Nöten war.

Meinen Kollegen am Institut, deren Liste den Rahmen dieser Danksagung sprengen würde, und meinen Mitstreitern in der Promotionsphase danke ich für ihre herzliche Aufnahme in Jena, ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft, nicht nur über wissenschaftliche Fragestellungen und die schönen gemeinsamen Abende die dazu beitrugen den Kopf wieder frei zu bekommen. Mein besonderer Dank geht hier an: **André Schmidt, Alexander Stößel, Benjamin Wipfler, Bettina Hesse, Dr. Cornelia Krauß, Dr. Frank Hünefeld, Dr. Frank Friedrich, Dr. Heiko Stark, John Nyakatura, Katharina Schneeberg, Sabine Moritz und Dr. Susanne Neupert.**

Die Mitglieder der Arbeitsgruppe porifera.net: **Cornelia Heer, Corina Scheer, Christopher Arnold, Florian Wolf, Martin Mehlhorn, Dr. Isabel Heim und Kathrin Kirste** sorgten immer für ein angenehmes Arbeitsklima und kollegiales Umfeld. Für ihre Unterstützung und Zuarbeit, sowie ihre Diskussionsbereitschaft bin ich ihnen sehr dankbar.

Meine Freunde **Dr. Simon Stutz, Dr. Katharina Kittelmann und Michael Goller** zeigten immer Verständnis wenn ich sie wieder einmal auf einen späteren Termin vertrösten musste. Die schönen Diskussionsabende, gemeinsamen Ausflüge und ihre aufmunternden Worte trugen dazu bei den Kopf frei zu bekommen und mit neuer Energie ans Werk zu gehen.

Meine **Eltern** und meine **Familie** trugen durch ihre finanzielle und ideelle Unterstützung über die vielen Jahre dazu bei, dass ich den von mir gewählten Weg gehen konnte. Mit Sicherheit war es nicht immer leicht zu verstehen, wenn ich sie wieder einmal vertrösten musste und statt bei ihnen zu sein, das Wochenende im Labor verbrachte.

Mein besonderer Dank gilt **Bianka Schneider**, die mir mit ihrer Liebe und Aufmunterungen zum Durchhalten eine fortwährende Stütze war.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	i
Zusammenfassung .....	1
Summary .....	2
1 Einleitung .....	5
2 Problemstellung und Zielsetzung .....	15
3 Material und Techniken .....	19
3.1 Versuchstiere und Kultivierung .....	19
3.1.1 Hälterung .....	19
3.1.2 Gewinnung und Aufzucht von Knospen .....	19
3.2 Röntgen-Mikrotomografie .....	20
3.2.1 Probenvorbereitung für die Synchrotronstrahlungsbasierte Röntgen-Mikrotomografie (SR- $\mu$ CT) .....	20
3.2.2 Kanalsystemabgüsse ( <i>Corrosion Casts</i> ) .....	21
3.2.3 Synchrotronstrahlungsbasierte Röntgen-Mikrotomografie .....	21
3.3 Bildverarbeitung .....	22
3.3.1 Bildverarbeitung für Analysen zur Knospenentwicklung .....	22
3.3.2 Bildverarbeitung für Analysen des Wasserleitungssystems .....	24
3.3.3 Volume Rendering .....	26
3.3.4 Volume Renderings des Wasserleitungssystems .....	27
3.3.5 Quantitative Bildanalyse für die Knospenentwicklung .....	27
3.3.6 Quantitative Bildanalyse des Wasserleitungssystems .....	28
3.4 Licht- und Elektronenmikroskopie .....	30
3.4.1 Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie .....	30
3.4.2 Rasterelektronenmikroskopische Histologie .....	30
3.4.3 Ingestion von Bäckerhefe durch <i>Tethya wilhelma</i> -Knospen .....	31
3.5 Zeitrafferfotografie .....	31
3.6 Molekulargenetische Techniken .....	31
3.6.1 Expressionsplasmid zur Herstellung von Aktin-dsRNA .....	31
3.6.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	33
3.6.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen .....	33
3.6.4 Herstellung von Aktin-dsRNA .....	33
3.6.5 Versuchsaufbau für die Genexpressionskontrolle in <i>T. wilhelma</i> .....	34
3.6.6 RNA-Extraktion .....	36
3.6.7 cDNA-Synthese .....	36

3.6.8	Sequenzierung .....	37
3.6.9	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	37
4	Ergebnisse .....	39
4.1	Knospenentwicklung in <i>Tethya wilhelma</i> .....	39
4.1.1	Entwicklungsdauer des Knospungsprozesses .....	39
4.1.2	Auflösung und Interpretation von SR- $\mu$ CT Datensätzen .....	41
4.1.3	Grundsätzliche Ergebnisse der qualitativen und quantitativen SR- $\mu$ CT Bildanalyse von Knospen .....	41
4.1.4	Merkmale unterschiedlicher Knospenstadien von <i>Tethya wilhelma</i> .....	45
4.1.5	Kontraktionsfähigkeit und Funktionalität des .....	53
	Wasserleitungssystems in Stadium 4-Knospen .....	53
4.1.6	Entwicklung des Wasserleitungssystems .....	55
4.2	Das Wasserleitungssystem adulter Individuen von <i>Tethya wilhelma</i> .....	57
4.2.1	Zellulärer Aufbau des Wasserleitungssystems .....	57
4.2.2	Topologie des Wasserleitungssystems .....	61
4.3	Fütterungsinduzierte RNA-Interferenz in <i>Tethya wilhelma</i> .....	70
4.3.1	Bestimmung des Fütterungsintervalles zur Aufnahme von dsRNA .....	70
4.3.2	Evaluierung der Primer und des endogenen Referenzgens .....	71
4.3.3	Regulation der Aktin-Expression in <i>Tethya wilhelma</i> .....	72
4.3.4	Phänotypen von Aktin-inhibierten <i>Tethya wilhelma</i> -Jungschwämmen .....	73
5	Diskussion .....	75
6	Literaturverzeichnis .....	101
7	Anhang .....	A-1
	Anhang 1: Filme (Quicktime-Format auf CD) .....	A-1
	Anhang 2: ImageJ Makros (txt-Format auf CD) .....	A-2
	Anhang 3: Publikationen (PDF-Format auf CD) .....	A-3
	Anhang 4: Verzeichnis der Abkürzungen .....	A-4

## Zusammenfassung

Schwämme (Porifera) stellen das phylogenetisch älteste rezente Phylum der Metazoa dar. Als Schwestergruppe der übrigen Metazoa nehmen sie eine Schlüsselstellung für unser Verständnis der Evolution der vielzelligen Tiere ein. In den letzten Jahren sind in diesem Zusammenhang, in Folge der Verfügbarkeit vollständiger Genome unterschiedlicher basaler Metazoa besonders Entwicklungsgene in den Fokus der evolutionären Entwicklungsbiologie gerückt. Die morphogenetischen Prozesse der Metazoa werden im Allgemeinen von Entwicklungsgenen gesteuert. Die komplexen, komplementären Expressionsmuster, die diese in unterschiedlichen Taxa zeigen, führen zu der Diversität der beobachtbaren morphologischen Merkmale. Veränderungen in der Steuerung der räumlich-zeitlichen Expressionsmuster und Funktionalität dieser Gene in der Evolution sind essenzielle Ursachen der enormen Diversifikation der Baupläne der Metazoa. Um diese Veränderungen zu verstehen, werden vergleichende integrative Betrachtungen von morphologischen, bioinformatischen und entwicklungsgenetischen Untersuchungen benötigt. Funktionelle genetische Untersuchungen sind derzeit nur in einer sehr begrenzten Anzahl von Arten der basalen Metazoa möglich, jedoch bisher nicht in Schwämmen.

Um die Methode der reversen Genetik in Schwämmen nutzbar zu machen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll zur fütterungsinduzierten RNA-Interferenz in einem Vertreter der Demospongiae etabliert. Derartige Untersuchungen erfordern neben dem Zugang zu einer großen Anzahl an Versuchstieren auch eine detaillierte Kenntnis der Morphologie. Aufgrund des relativ langsamen Wachstums von Schwämmen ist es vorteilhaft, auf jüngere funktionelle Stadien zurückgreifen zu können. In der tropischen Schwammart *Tethya wilhelma* sind Knospen (asexuelle Vermehrungsstadien) in großer Zahl verfügbar. Jedoch war zu Beginn der Arbeit nur wenig über deren Entwicklung bekannt. Daher wurde die Knospenentwicklung in *T. wilhelma* mit dem Ziel der Identifizierung funktioneller Stadien von Jungschwämmen, die als Äquivalente adulter Individuen in morphologischen, physiologischen und genetischen Untersuchungen dienen können, erforscht. Es wurden vier distinkte Stadien im Verlauf der Knospenentwicklung beschrieben, die durch eine sequenzielle Reihe räumlich-zeitlicher Muster charakterisiert sind. Damit konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Knospenbildung in Schwämmen höher reguliert und geordnet ist als zuvor angenommen, sondern auch das früheste funktionell ausdifferenzierte Stadium in der Entwicklung der Knospen definiert werden.

In der Biologie von Schwämmen spielt das Wasserleitungssystem eine zentrale Rolle. Von seiner Funktionalität sind alle physiologischen Vorgänge indirekt abhängig. Im Kanalsystem erfolgt die Aufnahme von gelöster und partikulärer Nahrung, der Gasaustausch und der Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Die Funktionalität des Wasserleitungssystems ist essenziell für die in der vorliegenden Arbeit gewählte Technik der fütterungsinduzierten RNA-Interferenz. Das Wissen über die Entwicklung, Architektur und Funktionalität von Wasserleitungssystemen des komplexen Leucon-Typs war zuvor überwiegend auf spezielle morphologische Details und theoretische Betrachtungen begrenzt. Anhand von 3D-Modellen von Kanalsystemabgüssen konnten quantitative Daten im Kontext der Architektur von Schwammwasserleitungssystemen erhoben werden. Diese ermöglichten eine funktionsmorphologische Betrachtung der Architektur des Wasserleitungssystems unter Berücksichtigung von biophysikalischen und strömungsmechanischen Gesichtspunkten. Die Analysen ergaben, dass die Architektur des Kanalsystems im Kontext der allgemeinen Morphologie

des Schwammkörpers ein hoch effizientes Flüssigkeitstransportsystem darstellt. Die Untersuchungen der 3D-Architektur und morphometrischen Daten des Kanalsystems lieferten neue Hinweise auf die Funktion von Bypasselementen in Schwämmen, die die Regel eines unidirektionalen Wasserleitungssystems durch direkte Verbindungen des einführenden und ausführenden Kanalsystems brechen. Die detaillierte anatomische Analyse der zellulären Strukturen des Wasserleitungssystems konnten zwei Besonderheiten des Aufbaus von *T. wilhelma*-Choanozytenkammern identifizieren. In der Apopyle der Choanozytenkammer wurde, ein für die Schwämme neuer, die Apopyle überspannender siebartiger Zelltyp, sowie ein für die Hadromerida neuer Zelltyp, eine monocilierte Konuszelle, beschrieben. Diese sind vermutlich in der Regulation der internen Strömungsverhältnisse involviert. Die genannten Untersuchungen des Wasserleitungssystems wurden sowohl in adulten wie auch in juvenilen Schwämmen durchgeführt und ermöglichten in Letzteren die Identifikation des frühesten funktionellen Kanalsystems.

Die morphologischen Untersuchungen der Knospenentwicklung und des Wasserleitungssystems bildeten die Grundlage für die Etablierung des Protokolls zur fütterungsinduzierten RNA-Interferenz. Dieses konnte anhand der Regulation der Aktin-mRNA-Level in *T. wilhelma* verifiziert werden. Damit gelang ein bedeutender Durchbruch, da erstmalig Techniken der reversen Genetik in einem Vertreter der Porifera erfolgreich angewandt wurden. Die Technik stellt ein neues Werkzeug für zukünftige funktionelle genomische Untersuchungen in Schwämmen zur Verfügung.

## Summary

Sponges (Porifera) represent the phylogenetically most ancient recent phylum of the Metazoa. They encompass a key position for our understanding of multicellular animal evolution, as they are the sister group of all other metazoan clades. In recent years more and more genomic data of basal metazoans have become available and evolutionary developmental biologists have drawn their focus on developmental genes in the context of metazoan body plan diversification. Developmental processes in the Metazoa are generally controlled by developmental genes. Their complex complementary expression patterns in the various phyla give rise to the huge diversity of morphological characters. Functional alterations and changes in spatio-temporal expression patterns during evolution essentially account for the high diversity of metazoan body plans. In order to understand these changes comparative integrative morphological, bioinformatic and functional developmental studies are required. Currently, functional genomic studies of developmental processes are limited to a small number of species within the basal Metazoa, excluding sponges.

In order to make reverse genetics available in poriferans as well, a protocol for feeding induced RNA interference was established in a demosponge. Such kind of experiments require access to high numbers of individuals and a thorough knowledge of morphology. Due to the relatively slow growth of sponges it is advantageous to have juvenile functional individuals available. In the tropic species *Tethya wilhelma* buds (asexual reproduction bodies) are accessible in high numbers. Unfortunately, only little was known about their development in the initial phase of this study. Therefore, bud development in *T. wilhelma* was investigated in order to identify the earliest functional stages, which could serve as functional

representatives in morphological, physiological and genetic studies. Four distinct stages were identified for bud development, characterised by a sequential series of spatio-temporal morphological patterns. Besides the fact that budding in sponges seems to be more highly regulated and controlled than previously assumed, this also led to the identification of the earliest functionally differentiated juvenile sponges in bud development.

The circulatory aquiferous system plays a central role in the life of a sponge. All physiological processes are implicitly dependent of its functionality. Elementary processes like particle filtration, gas exchange and excretion are functions of the canal system. Functionality of the aquiferous system is essential for the chosen technique of feeding induced RNA interference in this study. Knowledge about aquiferous system development, architecture and functionality of the complex leucon type was previously limited to detailed morphological aspects and theoretical consideration. Using 3D models based on corrosion casts quantitative data was collected in the context of canal system architecture. These data allowed for functional morphological considerations of the canal system architecture regarding biophysical and hydrodynamic aspects. The aquiferous system in sponges turned out to be a highly efficient fluid transport system in respects of the general anatomy. Studies of the 3D architecture and morphometric data revealed new aspects of the function of bypass elements in sponges. The presence of these elements breaks the rule of exclusive unidirectional water flow, due to directly linked connections between the incurrent and excurrent system. Detailed anatomical analysis of cellular structures in the canal system identified two characteristic features of *T. wilhelma* choanocyte chambers. One is a sieve-like celltype spanning the apopylar opening of the chamber, which has never been described before in sponges. The second is the presence of monociliated cone cells in the apopyle, which were described in Hadromerida for the first time in this study. Both cell types are likely to be involved in regulating internal flow velocities. All studies were performed in adult as well as in juvenile individuals and enabled the identification of the earliest functional canal system in developing sponges.

The results of my morphological studies on sponge budding and the aquiferous system anatomy represent essential prerequisites for establishing the feeding induced RNA-interference protocol. The newly developed protocol was functionally verified by knock-down of actin gene expression in *T. wilhelma*. This result represents a major breakthrough, since reverse genetic tools were for the first time successfully applied in a member of the Porifera. This will allow for further functional genomic studies in the future.





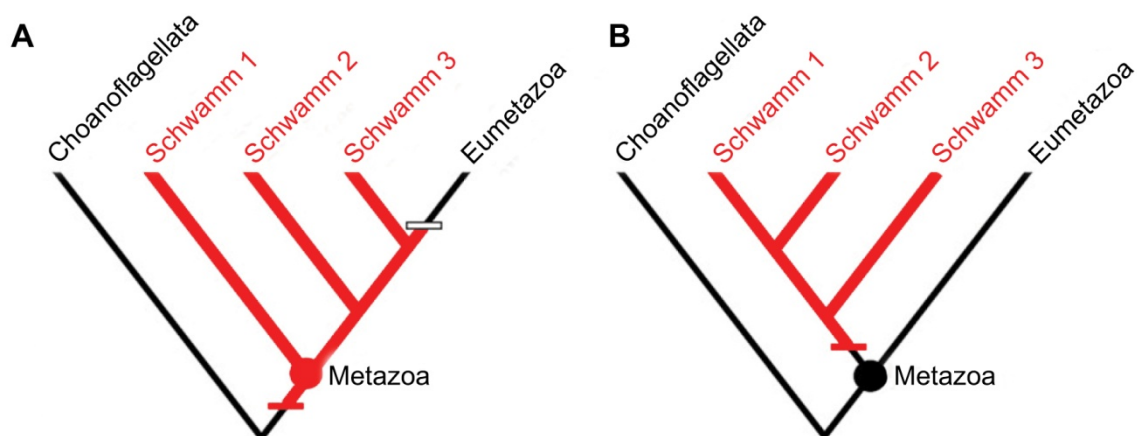
# 1 Einleitung

## Das Phylum Porifera Grant 1836

Das Phylum Porifera stellt mit rund 8000 beschriebenen Arten die phylogenetisch ursprünglichste rezente Gruppe der Metazoa dar. Paläontologische Befunde weisen darauf hin, dass die Schwämme die ältesten rezenten vielzelligen Tiere sind, deren fossile Funde bis in das frühe Proterozoikum zurück reichen (Brasier et al. 1997; Li et al. 1998; Reitner & Wörheide 2002).

Die Phylogenie der Schwämme wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Vor allem erste molekulargenetische Ergebnisse basierend auf mitochondrialen Genomsequenzen, aber auch umfangreichere phylogenomische Analysen, die eine Paraphylie der Porifera postulierten, sorgten für Aufsehen (Abbildung 1A, Borchellini et al. 2001; Dunn et al. 2008). Aus der postulierten Paraphylie der Porifera würden sich weitreichende Konsequenzen für unser Verständnis der Evolution der Metazoa ergeben. In diesem Fall hätte der letzte gemeinsame Vorfahre der Porifera und der übrigen Metazoa, einen schwammähnlichen Bauplan aufgewiesen. Neuere phylogenomische Analysen jedoch unterstützen die Monophylie der Schwämme und befinden sich im Einklang mit morphologischen Befunden (Abbildung 1B, Philippe et al. 2009). Nach aktuellem Stand können somit vier Großgruppen unterschieden werden, die taxonomisch als Klassen angesprochen werden: Die Demospongiae und Hexactinellida, die als Phylum Silicea die Schwestergruppe zu einem Phylum aus Calcarea und Homoscleromorpha bilden.

Die Poriferen sind als sessile Filtrierer in nahezu allen marinen sowie wie in einigen limnischen Habitaten zu finden (Bergquist 1978). Sie sind gekennzeichnet durch ein ausgeprägtes Wasserleitungssystem, welches den gesamten Körper durchzieht. Die innere und äußere Oberfläche wird von einer einschichtigen epidermalen Zellschicht ausgekleidet: dem Pinacoderm und Choanoderm. Das Pinacoderm bilden abgeflachte epidermale Zellen, die je nach ihrer Lage im Schwammkörper als Exo- (äußere Oberfläche bildend), Endo- (innere Oberfläche bildend) oder Basopinacozyten (den Substratkontakt vermittelnd) bezeichnet werden. Das Choanoderm, das von Choanozyten gebildet wird, kleidet die innere Oberfläche in den Choanozytenkammern aus. Die Choanozytenkammern stellen funktionelle



**Abbildung 1:** Verallgemeinerte phylogenetische Szenarien zur Evolution des Schwammbauplans (rot markiert) unter Annahme (A) der Paraphylie der Schwämme und (B) der Monophylie der Schwämme. (verändert nach Philippe et al. 2009)

Einheiten dar, die die für die Wasserbewegung benötigte Pumpleistung generieren. Über in der äußeren Oberfläche befindliche Poren (Ostia) wird Wasser in den Poriferenkörper gesaugt. Dieses gelangt über das meist weitverzweigte einführende Wasserleitungssystem in die zwischengeschalteten Choanozytenkammern und verlässt den Schwammkörper über ein Netzwerk an ausführenden Kanälen, das meist in ein oder mehreren makroskopisch sichtbaren Ausstromöffnungen (Oscula) endet. Im Kanalsystem wird Sauerstoff, gelöste und partikuläre Nahrung von Endopinacozyten und Choanozyten aufgenommen. Die weiteren spezialisierten Zelltypen finden sich im mit hauptsächlich mit Kollagen-Fibrillen angefüllten Extrazellularraum und sind meist amöboid beweglich. Die extrazelluläre Matrix und die darin eingebetteten Zellen bilden das bindegewebsartige<sup>1</sup> Mesohyl. In der Regel besitzen die Poriferen ein aus organischen oder mineralischen Bestandteilen aufgebautes Endoskelett. Die organischen Skelettbestandteile stellen die Spongin- und Kollagen-Fibrillen des Mesohyls dar. In diese sind die mineralischen Skelettelemente bestehend aus Kalziumkarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) oder amorphen Silikaten ( $\text{SiO}_2$ ) in Form diskreter oder fusionierter Skleren (Spicula) meist in Gruppen eingebettet. Die Synthese der Skelettelemente erfolgt durch spezialisierte Zellen. Die Kollagen-Fibrillen des Mesohyls werden von mobilen Kollazyten und Lophozyten, die Spongin-Fasern von Spongozyten synthetisiert. Die Synthese der Spicula wird von Sklerozyten bewerkstelligt und erfolgt entweder intra- oder extrazellulär (Simpson 1984).

### **Das Wasserleitungssystem der Poriferen – Funktionelle Morphologie und Anatomie**

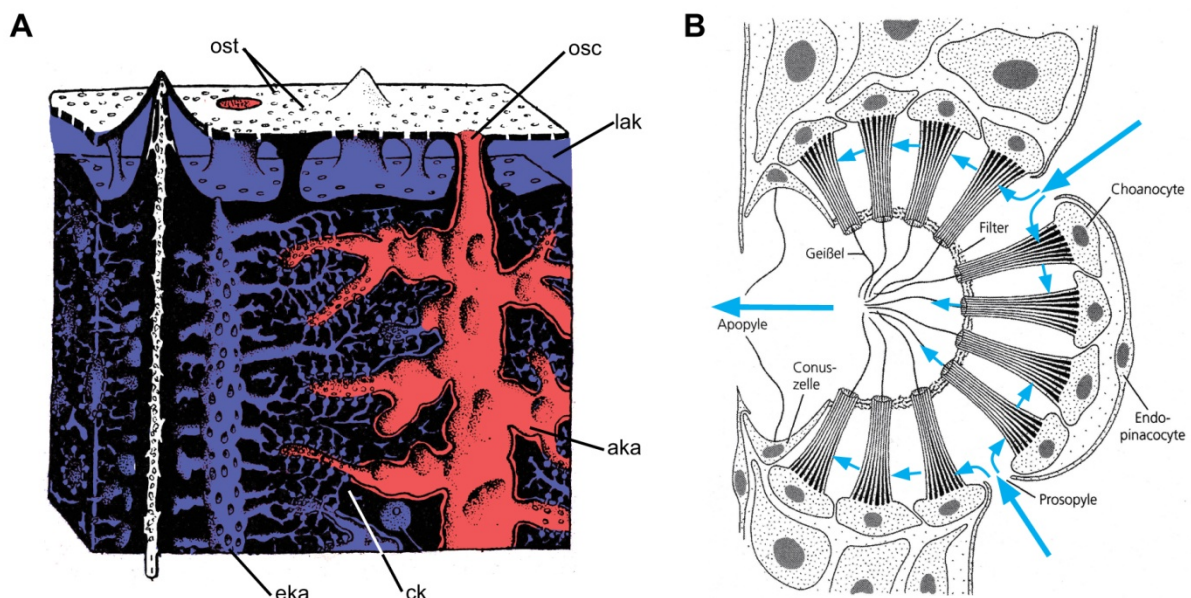
Das Wasserleitungssystem ist ein Hauptmerkmal der Schwammanatomie und unter funktionellen Gesichtspunkten, neben den strukturegebenden Skelettelementen, die bedeutendste Organisationseinheit. Als sessile Filtrierer sind alle physiologischen Vorgänge in Schwämmen davon abhängig, ein großes Volumen an Wasser durch den Körper zu pumpen, um die benötigten Nährstoffe und Sauerstoff zu gewinnen und Stoffwechselendprodukte abzutransportieren. Aus morphologischer Sicht bilden die folgenden Elemente die Strukturen des Wasserleitungssystems (Simpson 1984): Ostia (Einstromöffnungen an der äußeren Oberfläche), einführend Kanäle, Apopylen (Öffnungen der Choanozytenkammern zum ausführenden Kanalsystem), Choanozytenkammern, Prosopylen (Öffnungen der Choanozytenkammern zum einführenden Kanalsystem), ausführende Kanäle und das Osculum (Ausstromöffnung). Je nach Anordnung dieser Strukturen können drei unterschiedliche Organisationsformen von Wasserleitungssystemen in Schwämmen unterschieden werden: der Ascon-, Sycon- und Leucon-Typ (Bergquist 1978). In allen Formen wird das Wasserleitungssystem als unidirektionales Flüssigkeitstransportsystem angesehen. Die meisten Schwämme weisen ein Wasserleitungssystem des Lycon-Typs auf (Abbildung 2A), darunter auch alle Vertreter der Demospongiae. Lediglich in den Calcarea und einigen Hexactinellida finden sich die weniger komplexen und abgeleiteten Sycon- und Ascon-Typen, die hier nicht weiter behandelt werden sollen. Die Wasserleitungssysteme des Leucon-Typs sind durch eine Organisation der Choanozyten in einzelnen Choanozytenkammern gekennzeichnet. Diese sind über das gesamte Mesohyl verteilt, und über ein komplexes Netzwerk von Kanälen mit dem einführenden und ausführenden Wasserleitungssystem verbunden.

<sup>1</sup> Begriffsnutzung "Bindegewebe" im Sinne von Stark und Siewing (1980)

Die Architektur des Wasserleitungssystems lässt sich anhand von physikalischen Randbedingungen verstehen, die auf alle biologischen Flüssigkeits- und Gastransportsysteme zutreffen (LaBarbera 1990). In Schwämmen, wie in vielen anderen Organismen, spielt Gasaustausch eine zentrale Rolle, da alle Schwammzellen auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung angewiesen sind. Der Transport von Sauerstoff im Gewebe stellt einen Diffusionsprozess dar, der sowohl konzentrations-, wie auch distanzabhängig ist. Diese Abhängigkeit zeigt sich im ersten Fick'schen Gesetz:

$$\frac{dS}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dC}{dx}$$

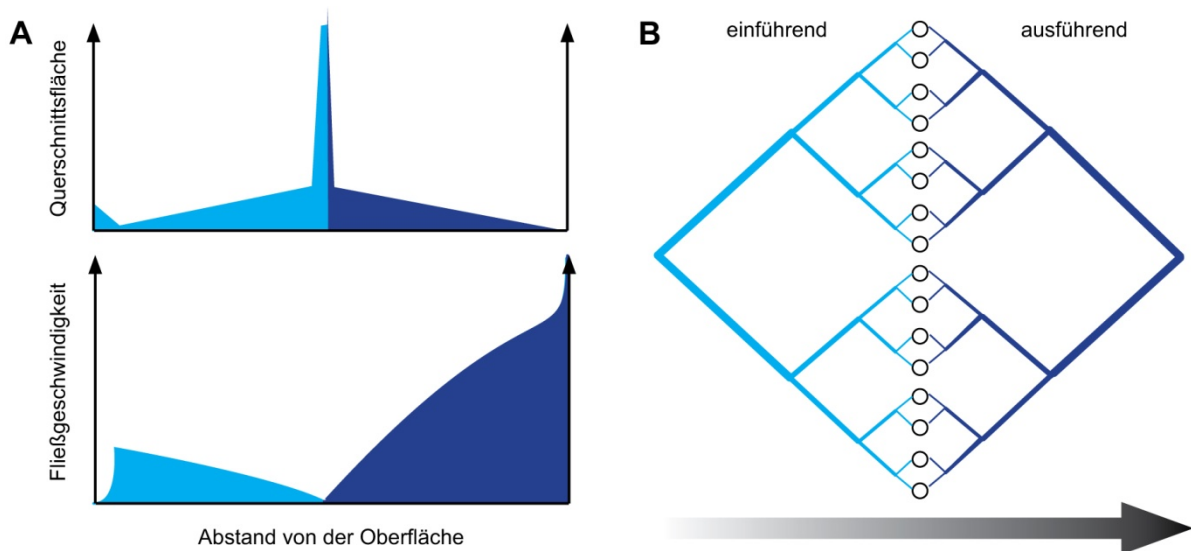
Hierin stellt  $dS/dt$  die Diffusionsrate,  $D$  die Diffusionskonstante,  $A$  die Diffusionsstrecke und  $dC/dx$  den Konzentrationsgradient dar. Aus der Gleichung wird die inverse Abhängigkeit der Diffusionsrate von der Diffusionsstrecke ersichtlich. Für biologische Systeme leitet sich daraus ab, dass nur begrenzte Bereiche über diffusionslimitierte Prozesse effektiv versorgt werden können. Auf das Wasserleitungssystem in Schwämmen übertragen bedeutet dies, dass entweder die Architektur des Kanalsystems die realisierbaren Wuchsformen beschränkt, oder umgekehrt die Wuchsformen die Komplexität des Kanalsystems bedingen. Unabhängig von der Betrachtungsweise führt dies zum Schluss, dass die Wuchsformen und die zu beobachtende Komplexität des Kanalsystems miteinander korreliert sind. Dies ist einer der Gründe weshalb Schwämme mit einem asconoiden oder syconoiden Wasserleitungssystem eher klein sind, und das die röhrenförmigen Körper bildende Gewebe eher dünn ist. Jedoch spielen auch strömungsmechanische Gründe eine Rolle, weshalb Schwämme mit diesen Wasserleitungssystemtypen nicht größer werden können. Nur der Leucon-Typ erlaubt auch große massive und kugelförmige Wuchsformen, da durch die gleichmäßige Verteilung der Kanalsystemelemente im gesamten Schwammkörper überall eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet ist.



**Abbildung 2:** (A) Schematischer Aufbau eines leuconoiden Wasserleitungssystems. (aka – ausführender Kanal, eka – einführender Kanal, ck – Choanozytenkammer, osc – Osculum, ost – Ostium). (B) Schema der Strömungsrichtung in einer Choanozytenkammer. Durch die Cilienbewegung wird Wasser in Richtung des Zentrums der Choanozytenkammer und aus der Apopyle hinaus gedrängt. Daraus ergibt sich ein Unterdruck an der Prosopyle und Wasser aus dem einführenden Kanalsystem strömt nach und passiert die Mikrovillissäume (verändert nach Kilian 1993; und Ax 1995).

Die eigentliche aktive Strömungserzeugung wird von Choanozyten durch die Cilienbewegung bewerkstelligt. Der Mikrovillisaum der Choanozyten wirkt hier als Strömungsbarriere und kanalisiert unterstützend die in Richtung des Zentrums der Choanozytenkammern gerichtete Strömung (Abbildung 2B). Infolge der Anordnung aller Choanozyten in einer Kammer ergibt sich somit eine resultierende Strömung, die zur Apopyle gerichtet ist und das Wasser in das ausführende Kanalsystem drängt. Betrachtet man Choanozytenkammern als Einheit, so können sie als positive Verdrängungspumpen, oder in einem technischen Vergleich als Peristaltikpumpen verstanden werden (Vogel 1983; Larsen & Riisgard 1994). Obwohl die von einzelnen Choanozytenkammern generierten Drücke und daraus resultierenden Strömungen sehr gering sind, können durch eine massive Parallelschaltung von Choanozytenkammern in Kombination mit einer Veränderung der Querschnittsfläche über die Systemlänge, relativ hohe Strömungen generiert werden (Abbildung 3, Reiswig 1975). Durch die Fusionierung von kleineren zu größeren Kanälen kommt es so innerhalb weniger Verzweigungspunkte zu einer enormen Reduktion der wirksamen Querschnittsfläche, die aufgrund der Kontinuität der Strömung zu einer deutlichen Erhöhung der Fließgeschwindigkeit führt. Auf diese Weise sind Schwämme in der Lage, trotz der geringen Pumpleistung einzelner Choanozytenkammern das Vielfache ihres eigenen Körpervolumens in kurzer Zeit durch den Körper zu pumpen. Das durch die Choanozyten in das ausführende Wasserleitungssystem verdrängte Wasser führt zu einem Unterdruck an der Prosopyle der sich in das einführenden Wasserleitungssystem fortsetzt, sodass umgebendes Wasser über Ostia in den Schwamm und das einführende Wasserleitungssystem eingesaugt wird. Im einführenden Wasserleitungssystem kommt es im Vergleich zum ausführenden System zum umgekehrten Effekt: durch die stetige Verzweigung der einführenden Kanäle in Kanäle mit kleinerem Durchmesser kommt es zu einer enormen Vergrößerung der Querschnittsfläche und damit zu einer Reduktion der Fließgeschwindigkeit (Abbildung 3).

Dieses Prinzip eines sich verzweigenden Kanalsystems, in dessen Folge es durch eine Vergrößerung der Querschnittsfläche zu einer Reduktion der Strömungsgeschwindigkeit kommt, ist nicht nur im Wasserleitungssystem von Schwämmen realisiert, sondern kann in einer Vielzahl sich verzweigender biologischer Flüssigkeits- und Gastransportsystemen gefunden werden (LaBarbera 1990). Daher wurde das Wasserleitungssystem von Schwämmen hinsichtlich der Architektur gelegentlich mit dem menschlichen Blutkreislauf- oder Bronchialsystem verglichen (LaBarbera 1990; Bavestrello et al. 1995). Letzteres kann jedoch nur bedingt für einen Vergleich herangezogen werden, da es ein bidirektionales Transportsystem darstellt, bei dem der Gasstrom im sich hierarchisch verzweigenden Netzwerk in beide Richtungen erfolgt. Die Architektur solcher biologischer, sich verzweigender Flüssigkeits- und Gastransportsysteme lässt sich jedoch allgemein durch Murrays Gesetz beschreiben, welches neben hydrodynamischen Randbedingungen auch die Kosten für die Bildung und Unterhaltung solcher Systeme berücksichtigt (Murray 1926; Vogel 1983). Vereinfacht ausgedrückt besagt dieses, dass die Summe der Radien hoch drei von Kanälen hinter einem Verzweigungspunkt gleich dem Radius hoch drei des sich verzweigenden Kanals ist. Aus funktioneller Sicht bedeutet dies für ein sich zweifach verzweigendes System, dass in jedem Verzweigungspunkt die Querschnittsfläche für einzelne Kanäle auf 63 % reduziert, die gesamte Querschnittsfläche infolgedessen aber vergrößert wird und damit die Strömungsgeschwindigkeit in jedem Verzweigungsschritt um 26 % abnimmt (Vogel 1983, vgl. auch Abbildung 3).



**Abbildung 3:** (A) Schematische Darstellung der Querschnittsfläche und der resultierenden Fließgeschwindigkeiten im Schwammwasserleitungssystem. Bereiche des einführenden Kanalsystems sind hellblau, Abschnitte des ausführenden Kanalsystems dunkelblau eingefärbt. Auf der Ebene der Choanozytenkammern kommt es zu einer enormen Vergrößerung der Querschnittsfläche die zu sehr geringen Fließgeschwindigkeiten führt. (B) Schema der Kanalarchitektur eines Schwammwasserleitungssystems. Infolge einer stetigen Verzweigung von Kanälen des einführenden Wasserleitungssystems die zu einer Reduktion der Kanaldurchmesser führt kommt es zu einer Vergrößerung der gesamten Querschnittsfläche, die auf der Ebene der Choanozytenkammern (Kreise) ihr Maximum erreicht (vgl. Schema in A). Im ausführenden Kanalsystem findet das umgekehrte Prinzip Anwendung. Durch eine Verringerung der gesamten Querschnittsfläche kommt es zu einer Erhöhung der Fließgeschwindigkeit (nach Reiswig 1975).

Derartige Betrachtungen in Schwämmen erfordern jedoch eine detaillierte Kenntnis der Morphologie des Wasserleitungssystems, die bisher nur begrenzt vorhanden ist. Frühere Arbeiten zur Fluidynamik in Schwammwasserleitungssystemen sind daher überwiegend theoretischer Natur, konnten jedoch anhand der aufgestellten Modelle zum Verständnis dieser Systeme beitragen (Reiswig 1975; Larsen & Riisgard 1994). Insbesondere war lange Zeit die Kenntnis der komplexen Wasserleitungssysteme des Leucon-Typs sehr begrenzt. Bedeutende Fortschritte konnten hier erst mit der Einführung der Rasterelektronenmikroskopie und später durch den Einsatz von Polymerabgüssen des Wasserleitungssystems erzielt werden (Bavestrello et al. 1988). Diese lieferten vor allem detaillierte Informationen zu speziellen Bereichen der einführenden und ausführenden Kanalsystembereiche. Die Arbeiten zeigten Verbindungen, bei denen das durch den Schwamm strömende Wasser ohne Choanozytenkammern zu passieren, aus dem einführenden in das ausführende Wasserleitungssystem gelangen kann (Bavestrello et al. 1988). Diese Bypasselemente stellen einen Bruch der traditionellen Sicht eines unidirektionalen Wasserleitungssystems in Schwämmen dar. Ihre Funktion ist bisher nur wenig verstanden, könnte aber mit der in einigen Arten sehr ausgeprägten Fähigkeit zu Körperkontraktionen, wie sie beispielsweise bei *Tethya wilhelma* SARÁ, SARÁ, NICKEL & BRÜMMER, 2001 beobachtet werden können (Nickel 2004; Nickel et al. 2006b), in Verbindung stehen. Für ein besseres Verständnis von Wasserleitungssystemen sind daher vollständige 3D-Modelle von Nöten, welche die für biophysikalische Betrachtungen benötigten quantitativen Daten liefern können. Auf diese Notwendigkeit wies schon Simpson (1984) in seinem Kompendium zur Schwammbiologie hin, jedoch sind hierzu bis heute nur Teildatensätze verfügbar.

## Reproduktion in Poriferen

Schwämme (Porifera) zeigen einen weiten Bereich von Reproduktionsstrategien, die sowohl sexuelle, wie auch asexuelle Formen umfassen. Die sexuelle Vermehrung in Schwämmen zeigt eine hohe Variabilität der beobachtbaren Stadien und Prozesse. Da sie für die vorliegende Arbeit von untergeordnetem Interesse sind, sollen an dieser Stelle nur einige allgemeinere Aussagen zu diesem Thema angeführt werden. Für detaillierte Informationen zur sexuellen Vermehrung in Schwämmen sei vor allem auf das aktuelle und umfangreiche Werk zur vergleichenden Embryologie von Schwämmen von Ereskovsky (2010) hingewiesen, sowie auf die etwas kürzeren Zusammenfassungen von Simpson (1984) und Bergquist (1978).

Schwämme besitzen keine Gonaden. Im Allgemeinen verläuft die Gametogenese sehr unterschiedlich, jedoch ist der Ursprung der Gameten durch direkte Transformation aus somatischen Zellen (Archaeocyten oder Choanozyten) ein charakteristisches Merkmal aller Arten. Die meisten Arten weisen einfache Spermien auf, die durch ein großes cytoplasmatisches Volumen und einige Mitochondrien charakterisiert sind, jedoch meist kein Akrosom besitzen. Dieses konnte nur bei den Homoscleromorpha und einigen Poecilosclerida nachgewiesen werden. Die weiblichen Gameten entwickeln sich in der Regel im Choanosom an unterschiedlichen Stellen, gelegentlich auch in kleinen Ansammlungen. Dies trifft zumindest auf alle oviparen und ovoviviparen Schwämme zu. Es wird ein oligolecithales Ei gebildet, welches von umliegenden Zellen mit Nährstoffen versorgt wird.

Die Embryonalentwicklung bei ovoviviparen und viviparen Arten vollzieht sich in temporären Brutkammern, die oft auch als Follikel bezeichnet werden. Im Verlauf der Zellteilung können vier Teilungsmuster beobachtet werden, von denen ein der Radiärfurchung ähnlicher Typ bei den meisten Arten zu finden ist. Allgemein werden acht unterschiedliche Larven-Typen in Schwämmen unterschieden (Maldonado 2004). Diese können prinzipiell in einschichtige Larven mit Blastocoel und zweischichtige Larven ohne selbigen eingeteilt werden.

Auch asexuelle Vermehrung ist bei Schwämmen in unterschiedlichsten Ausprägungen zu finden und umfasst Knospung, Fragmentierung und Gemmulabildung (Fell 1993). Zumeist wird sie als eine Konsequenz der allgemeinen Fähigkeit zur ständigen Reorganisation dieser Gruppe interpretiert (Bond & Harris 1992). Der hohe Mobilitätsgrad aller Zellen im Mesohyl der Schwämme (ausgenommen der epitheloiden Pinacozyten) wird auch als „konstante Morphogenese“ beschrieben (Ereskovsky 2003).

Im Allgemeinen scheint asexuelle Vermehrung Teil des Grundmusters aller Metazoen zu sein (Schmidt-Rhaesa 2007). Jedoch sollten primäre agametische-asexuelle Vermehrungsmechanismen wie Teilung oder Knospung eindeutig von sekundären asexuellen Vermehrungsmechanismen, wie die Parthenogenese, unterschieden werden. Neben den Schwämmen findet sich primäre asexuelle Vermehrung in allen Nicht-Bilateria: Placozoa (Schulze 1891), Cnidaria (Campbell 1974) und Ctenophora (Pianka 1974) sowie in den meisten Bilateria (Schmidt-Rhaesa 2007), z. B. Teilung bei Plathelminthes. Weiterhin zeigen Fossilien aus dem Ediacarium vorwiegend koloniale Organismen, was ebenfalls darauf hinweist, dass die Fähigkeit zur Knospung ins Grundmuster der Metazoen gehört (Knoll 2004).

Es ist hilfreich zunächst die Vorgänge zu unterscheiden, die in Schwämmen allgemein als asexuelle Vermehrung beschrieben werden. Die Fragmentierung von Individuen stellt die einfachste Form dar. Sowohl unter ökologischen, wie auch unter populationsdynamischen



Gesichtspunkten vergrößert Fragmentierung die Ausbreitung und stellt somit eine wichtige Vermehrungsstrategie dar, welche in vielen Arten sogar die sexuelle Vermehrung übersteigt (Fell 1993; Maldonado 2006). Jedoch ist die Hauptvoraussetzung für diese Art der Vermehrung die allgemeine morphologische Plastizität und Fähigkeit zur Reorganisation der Schwämme.

Die Gemmulation in Süßwasserschwämmen wird oft als eine Form der asexuellen Vermehrung beschrieben, jedoch können Gemmula nicht als asexuelle Vermehrungskörper im engeren Sinne betrachtet werden. In den meisten Fällen dienen sie als Dauerstadien, die zur Überdauerung von ungünstigen Umweltbedingungen gebildet werden. Gemmula werden im Schwammgewebe in großer Zahl produziert und bleiben häufig in das Schwammskelett des Mutterschwammes eingebettet, wenn dieser abstirbt. Auch wenn es zur Verbreitung von Gemmula kommen kann (was in der Tat eine asexuelle Vermehrung darstellen würde), besiedeln sie doch in der Regel das Schwammskelett des ehemaligen Mutterschwamms (Weissenfels 1989). Gemmulabildung und –keimung stellt somit vermutlich eine mehrfach entstandene, hoch abgeleitete Form der Schwammmorphogenese dar, beschränkt auf Süßwasserschwämme (Unterordnung Spongillina) und wenige andere Familien.

Während sowohl Fragmentierung als auch Gemmulabildung eine Reihe von Funktionen im Lebenszyklus einiger Schwämme übernehmen, dient die Knospung nur einem Zweck: die Bildung der Knospen, deren Freisetzung und die anschließende Morphogenese sind ausschließlich Vorgänge, die der asexuellen Vermehrung dienen. Auch wenn Knospung nur in den Lebenszyklen der zwei Familien Polymastiidae und Tethyidae obligat ist, findet man sie dennoch in vielen, wenn nicht allen Demospongien (Fell 1993; Ereskovsky & Tokina 2007). Maas (1901) und Connes (1967) beschrieben einige grundlegende Prinzipien der Knospung in mediterranen *Tethya*-Arten. In frühen Stadien bestehen die gestielten Knospen aus einer homogenen Zellmasse, die sich um ein Sklerenbündel das aus dem Mutterschwamm herausragt, ordnet. Im Weiteren wandern Zellen aus dem Mutterschwamm in die Knospe, das Mineralskelett entwickelt sich und Cortex- und Choanodermbereiche beginnen zu differenzieren. Abschließend bricht die Knospe ab und entwickelt sich zu einem neuen Schwamm.

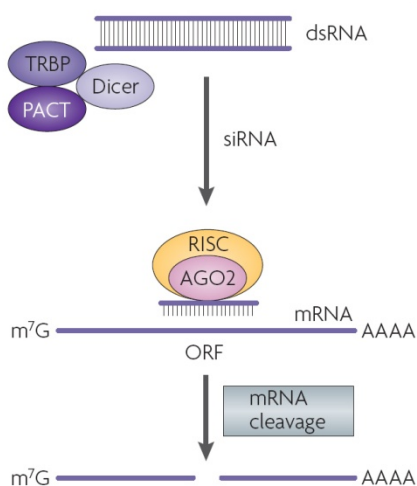
Alle Fälle von Knospung bei Schwämmen sind gekennzeichnet durch die Bildung von Zellanhäufungen, die auf eine mesenchymale Morphogenese hinweisen. Zusätzlich zeigten Ereskovsky und Kollegen kürzlich eine Form der epithelialen Knospung in Schwämmen der Gattung *Oscarella*, die zu den Homoscleromorpha gehören (Ereskovsky & Tokina 2007; Ereskovsky et al. 2009). Diese Form ähnelt der Knospung der Cnidarier stärker als die mesenchymale Knospung der übrigen Schwämme.

### **Werkzeuge der reversen Genetik für die Erforschung basaler Metazoa**

Aufgrund ihrer phylogenetischen Position als Schwestergruppe der übrigen Metazoa sind die Poriferen in den letzten Jahren auch im Kontext von Fragen aus der evolutionären Entwicklungsbiologie wieder stärker in den Fokus gerückt. In diesem Zusammenhang sind allgemein die basalen Vertreter der Metazoa, Porifera, Ctenophora, Placozoa und Cnidaria von großem Interesse, da sie eine wesentlich geringere Komplexität aufweisen und damit grundlegende Mechanismen und Prozesse in Entwicklungsvorgängen einfacher untersucht werden können. Daher werden derzeit umfangreiche Studien zu Expressionsmustern und vergleichende bioinformatische Untersuchungen der Genome basaler Metazoen durchgeführt um die Evolution und Diversifikation von Entwicklungsgenen und die damit

verbundene enorme Diversifikation morphologischer Merkmale und Baupläne in den Metazoa zu verstehen (Shimeld et al.; Larroux et al. 2006; Adamska et al. 2007; Jakob & Schierwater 2007; Erwin 2009). Bisher konnte eine Reihe von Entwicklungsgenen identifiziert werden die für die Metazoa als ubiquitär anzusehen sind. Bioinformatische Analysen und vergleichende Expressionsmuster-Untersuchungen alleine können jedoch nur begrenzt Aussagen über funktionale Veränderungen von Genen in Folge einer Duplikation, Mutation oder veränderten räumlich-zeitlichen Expression treffen (Ryan & Baxevanis 2007; Manuel 2009). Hierfür sind funktionelle genetische Untersuchungen unerlässlich, die in Kombination mit morphologischen und den zuvor genannten Untersuchungen, eine Aussage über funktionelle Veränderungen erlauben. Diese sind im Moment jedoch aufgrund technischer Beschränkungen nur in wenigen experimentellen Modellen der basalen Metazoa möglich (Dunn et al. 2007; Jakob & Schierwater 2007). In der klassischen Entwicklungsbiologie stehen hierfür eine Reihe von Techniken zur Verfügung, die jedoch an das experimentelle Modell angepasst werden müssen. Als eine relativ neue, aber sehr attraktive Technik hat sich die RNA-Interferenz in der Entwicklungsbiologie etabliert. Sie beruht auf dem Prinzip einer Inhibierung der Translation von mRNA durch einen von kurzen, komplementären RNA-Fragmenten aktivierten Proteinkomplex, der aktiv die Degradation der Ziel-mRNA katalysiert (Fire et al. 1998). Zunächst war die RNA-Interferenz auch unter den Begriffen post transcriptional gene silencing, transgene silencing und quelling bekannt bevor erkannt wurde, dass all diesen Phänomenen derselbe Mechanismus zugrunde liegt. Grundlegende Erkenntnisse dieses Prozesses lieferten die Untersuchungen der RNA-Interferenz im Nematoden *Caenorhabditis elegans* für die Andrew Fire und Craig C. Mello 2006 den Nobelpreis in Physiologie und Medizin erhielten (Fire et al. 1998).

Der RNAi-Prozess wird initiiert, indem durch das Enzym *dicer* lange doppelsträngige RNA (dsRNA) in kurze Fragmente von 20-25 bp zerkleinert wird. Einer der beiden Stränge jedes Fragmentes, der auch als der Leitstrang bezeichnet wird, wird in einen als RNA-induced silencing complex (*RISC*) bezeichneten Enzymkomplex inkorporiert. Dieses Fragment dient als Template, um mit der komplementären Sequenz einer mRNA zu paaren. Infolgedessen wird die so erkannte mRNA von der katalytischen Untereinheit (argonaut – *arg*) des *RISC*-Komplexes ebenfalls in kürzere Fragmente zerkleinert. Dies führt zu einer Erniedrigung der mRNA-Level des Zielgens und daraus resultierend zu einer Erniedrigung der Protein-Level



**Abbildung 4:** Mechanismus der RNA-Interferenz. Der RNA-Interferenz Prozess wird durch die Zerkleinerung von Doppelstrang RNA (dsRNA) durch den *dicer*-Komplex in Gang gesetzt. Der *RISC*-Komplex wird mit 20-25 bp langen RNA-Fragmenten beladen, die als Template genutzt werden, um komplementäre mRNA-Stränge zu identifizieren. Die Aktivität der katalytischen Untereinheit *ago* des *RISC*-Komplexes führt zu einer Degradation der mRNA. (modifiziert nach Kim & Rossi 2007)

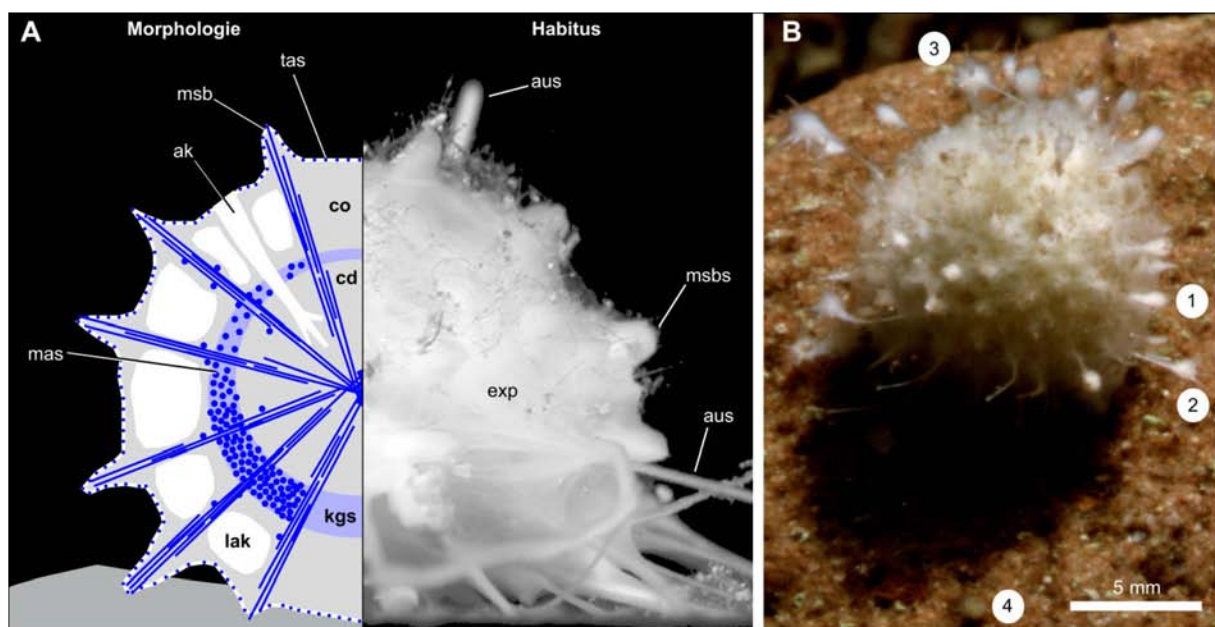


des Zielgens, da keine Translation stattfinden kann. Indem gezielt dsRNA für ein bestimmtes Zielgen in einen Organismus eingeschleust wird, kann dieser Mechanismus auch für funktionelle genetische Untersuchungen genutzt werden. Er führt jedoch nur zu einer Erniedrigung der Protein-Level des Zielgens und in den meisten Fällen nicht zu einer vollständigen Eliminierung des Zielproteins im betreffenden Organismus oder Gewebes, wie es beispielsweise in *Knock-out* Mutanten möglich ist, und wird daher auch als *Knock-down* bezeichnet. Jedoch bietet diese Technik eine höhere Variabilität im Bezug auf die Zielgene, da dsRNA der betreffenden Gene relativ einfach herzustellen ist, wenn die Sequenz des Zielgens bekannt ist. Damit stellt sie eine geeignete Methode für funktionelle genetische Untersuchungen dar, speziell in experimentellen Modellorganismen für die keine umfangreichen genetischen Techniken zur Verfügung stehen, um *Knock-out* Mutanten zu erstellen, oder die relative lange Generationszeiten aufweisen.

### Untersuchungen an einem Vertreter der Demospongiae

Die in der vorliegenden Arbeit angefertigten Untersuchungen wurden an der tropischen Schwammart *Tethya wilhelma* (Demospongiae, Hadromerida) durchgeführt (Abbildung 5). Diese stellte sich als geeignetes experimentelles Modell für Untersuchungen zur Schwamm-biologie heraus, da sie unter Laborbedingungen sehr einfach zu halten und zu vermehren ist. Derzeit ist sie eine der wenigen Schwammarten überhaupt, die unabhängig von Nachschub aus natürlichen Habitaten kultiviert werden kann.

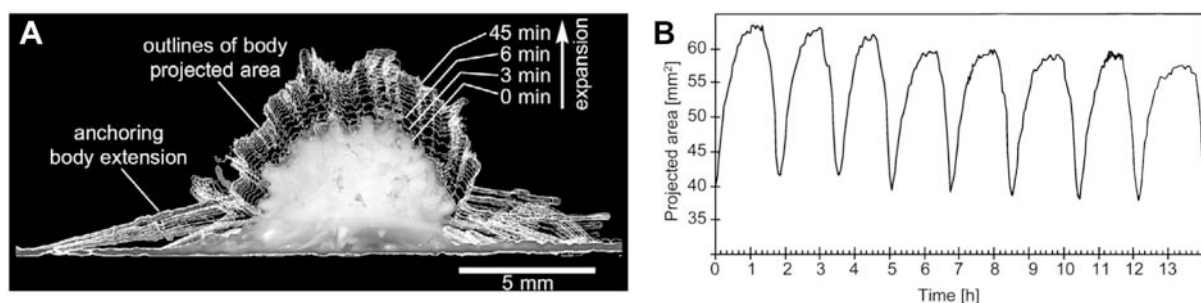
Adulte Individuen von *T. wilhelma* zeigen typischerweise eine sphärische Körperform mit ausgeprägtem äußeren Cortex und innen liegendem Choanosomkern (Abbildung 5). Der Cortex ist reich an Lakunen, während sich das Choanosom im Inneren durch eine hohe



**Abbildung 5:** Habitus, allgemeine Morphologie und Knospungsverhalten von *T. wilhelma*. (A) Morphologie (schematisch) (links) und Habitus (rechts) eines adulten Individuums von *T. wilhelma*. Elemente des Mineralskeletts sind blau, die Kollagenschicht hellblau, Gewebe grau und Kanäle sowie Lakunen weiß gefärbt (ak – ausführender Kanal, cd – Choanoderm, co – Cortex, exp – Exopinacoderm, aus – Ausläufer (Filament), kgs – Kollagengrenzschicht, lak – Lakune, mas – Megastere, msb – Megasklerenbündel, msbs – Megasklerenbündelspitze, tas – Tylaster (Micraster) Schicht). (B) Knospendes Individuum von *T. wilhelma* mit Stadium 1- bis 3-Knospen typischerweise noch mit dem Mutterschwamm verbundene und abgelöste Stadium 4-Knospen. (aus Hammel et al. 2009)

Zelldichte auszeichnet. Die Architektur des Silikatskeletts ist auffallend hoch organisiert. Es können drei Spicula-Typen unterschieden werden. Die monoaxialen Makrosklere vom Typ Anisostrongylen und die etwas kleineren Strongylen bilden in *T. wilhelma* die charakteristischen Sklerenbündel, die in allen *Tethya*-Arten zu finden sind. Diese breiten sich radiär vom Zentrum aus und bilden distal in manchen Fällen kleine Gabelungen. Megastern in Form von Spherastern finden sich vorwiegend im Grenzbereich zwischen Cortex und Choanosom eingebettet in eine Kollagenschicht im Mesohyl. Auf diese Weise bildet sich eine Megastersphäre die das Choanosom umschließt. Als dritter Typ finden sich Micrastern in dieser Art, die in zwei Kategorien eingeteilt werden können. Tylastern, die vorwiegend im Cortex anzutreffen sind und in Verbindung mit dem Exopinacoderm eine Tylasterschicht bilden. Der zweite Typ von Micrastern ist in Form von Strongylastern und manchmal auch als Oxyastern vorwiegend im Choanosom zu finden. Die hoch organisierte Megasterschicht des Skeletts bildet eine funktionelle Skelettstruktur, die als biologischer Verbundwerkstoffe in Form eines Partikel verstärkten Elastomers verstanden werden kann (Nickel *et al.* 2006a; Nickel *et al.* 2006b). Eben dieses spezielle morphologische Muster, welches für die meisten *Tethya* Arten typisch ist, trägt zur ausgeprägten Kontraktionsfähigkeit dieser Arten bei (Marshall 1885; Reiswig 1971; Nickel 2004). Im Verlauf der Körperkontraktionen kommt es zu einer bedeutenden Volumenreduzierung, die im Falle des Wasserleitungssystems bis zu 90 % betragen kann. Einzelne Exemplare zeigen eine individuelle, aber über lange Zeit gesehen, variable Rhythmik (Abbildung 6). Die Körperkontraktionen können vereinfacht in zwei Phasen eingeteilt werden. Die aktive Kontraktionsphase, welche vermutlich durch die Kontraktion des Pinacoderms hervorgerufen wird und die Expansionsphase, die vermutlich überwiegend passiv verläuft. In der Expansionsphase lassen sich ein Abschnitt, der eine etwas schnellere Kinetik aufweist, bei dem vermutlich im Gewebe durch Expansion im Verlauf der Kontraktion gespeicherte Energie freigesetzt wird, und ein langsamerer Abschnitt, der eventuell auf hydrostatische Effekte durch Inflation des Wasserleitungssystems zurück zu führen ist, beobachten (Nickel 2004).

Für *T. wilhelma* wurde bisher unter Laborbedingungen ausschließlich asexuelle Reproduktion durch Knospung beobachtet. Über die Vermehrung im natürlichen Lebensraum ist nichts bekannt. Die Knospenbildung findet das ganze Jahr über statt, und die Häufigkeit und Anzahl der gebildeten Knospen variiert zwischen einzelnen Individuen. Zu den spezifischen Faktoren, die die Knospung beeinflussen könnten, zählen die Wassertemperatur, der Salzgehalt und die Nährstoffverfügbarkeit (Ayling 1980).



**Abbildung 6:** (A) Expandierendes Exemplar von *T. wilhelma* mit überlagerten Umrissen aus Zeitrafferaufnahmen der projizierten Körperfläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Kontraktion. (B) Veränderung der projizierte Körperfläche eines regelmäßig kontrahierenden Exemplars von *T. wilhelma* über einen Zeitraum von 13 h (verändert nach Ellwanger & Nickel 2006).

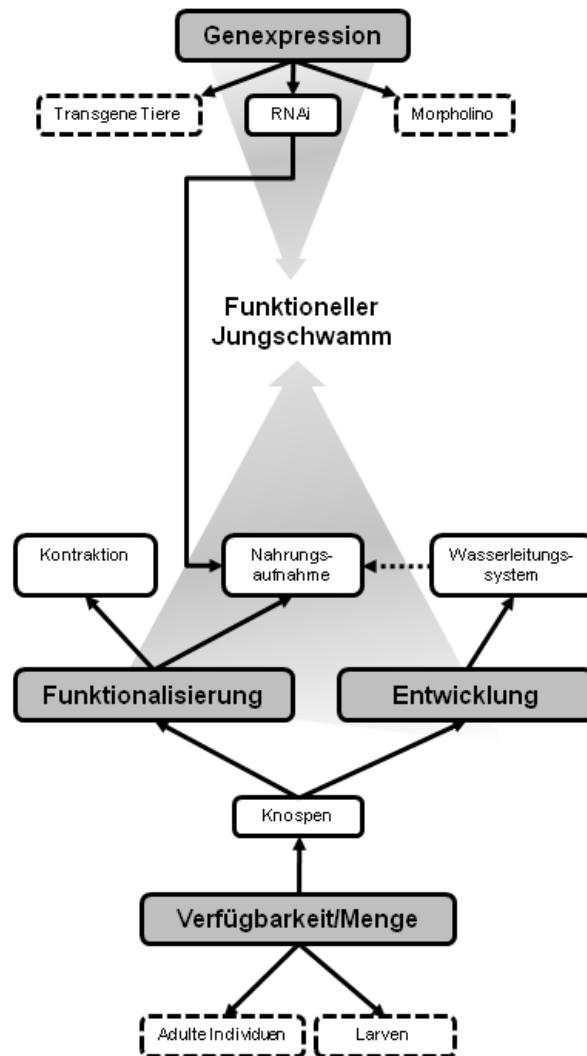
## 2 Problemstellung und Zielsetzung

In den letzten Jahren stieg die Zahl der verfügbaren genomischen Daten stark an, unter anderem auch für einige basale Metazoen. Dies ermöglicht funktionelle Untersuchungen an Genen und genregulatorischen Netzwerken in diesen Organismen. Derzeit sind die vollständigen Genome folgender basaler Metazoen verfügbar: *Trichoplax adhaerens* SCHULZE, 1883 (Srivastava *et al.* 2008), *Hydra magnipapillata* (ITO, 1947) (Chapman *et al.* 2010) und *Nematostella vectensis* STEPHENSON, 1935 (Putnam *et al.* 2007). Von großem Interesse im Kontext der Evolution der basalen Metazoen ist die Verfügbarkeit des Genoms des Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis* RUINEN, 1938 (King *et al.* 2008), hinsichtlich vergleichender Untersuchungen zur Vielzelligkeit. Das erste Schwammgenom von *Amphimedon queenslandica* HOOPER & VAN SOEST, 2006 befindet sich noch in der Phase der Assemblierung und Annotierung.

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte tropische Schwammart *Tethya wilhelma* werden in Kürze Informationen aus dem Transkriptom zur Verfügung stehen, die funktionelle genomische Untersuchungen ermöglichen werden. Für die meisten der oben genannten Organismen fehlen bisher entsprechende Protokolle, die funktionelle genomische Untersuchungen, z. B. an Entwicklungsgenen der *Wnt*-Familie, möglich machen. Lediglich neun Publikationen beschreiben bisher die Manipulation der Genexpression für funktionelle Untersuchungen von Genen und genregulatorischen Netzwerken in marinen Nicht-Bilateria (Jakob *et al.* 2004; Schubert *et al.* 2006; Dunn *et al.* 2007; Jakob & Schierwater 2007; Momose & Houliston 2007; Momose *et al.* 2008; Rentzsch *et al.* 2008; Saina *et al.* 2009; Yamada *et al.* 2010). Hiervon behandeln nur zwei Arbeiten die RNAi-induzierte Kontrolle der Genexpression in marinen Organismen (Dunn *et al.* 2007; Jakob & Schierwater 2007). Die Autoren entwickelten Protokolle für die Genexpressionskontrolle in *Eleutheria dichotoma* DE QUATREFAGES, 1842 (Jakob & Schierwater 2007) und *Aiptasia pallida* (AGASSIZ IN VERRILL, 1864) (Dunn *et al.* 2007). Die große Herausforderung besteht in der Anpassung der in anderen Modellorganismen optimierten Protokolle an das marine Medium.

Die Etablierung der Genexpressionskontrolle in Schwämmen würde eine Reihe funktioneller genomischer Untersuchungen von genregulatorischen Netzwerken ermöglichen. Hierzu zählen beispielsweise Studien an Entwicklungsgenen aus der *Wnt*- oder *LIM*-Familie (Adamska *et al.* 2007; Lapébie *et al.* 2009; Srivastava *et al.* 2010) im Kontext der evolutionären Entwicklungsbiologie basaler Metazoen. In diesem Zusammenhang sind Porifera von großem Interesse, da sie aufgrund ihrer phylogenetischen Position als Schwestergruppe der übrigen Metazoen eine Schlüsselstellung einnehmen. Darüber hinaus würden solche Techniken funktionelle morphologische Untersuchungen zu Fragen der Kontraktion und Integration in Schwämmen ermöglichen.

Ziel meiner Arbeit ist daher die Etablierung eines Protokolls zur Genexpressionskontrolle in einem Vertreter der Porifera. In diesem Zusammenhang ergeben sich die folgenden Problemstellungen, deren Verknüpfungen in Abbildung 7 schematisch dargestellt sind: 1. Auswahl der geeigneten Methode und Technik zur Genexpressionskontrolle, 2. Verfügbarkeit von Versuchstieren, 3. Detaillierte Kenntnis der Entwicklung, 4. Funktionelle Aspekte der Versuchstiere.



**Abbildung 7:** Schema der Problemstellungen im Zusammenhang mit der Etablierung eines Protokolls zur Genexpressionskontrolle in Schwämmen und deren Verknüpfungen untereinander (schwarze Pfeile). Funktionelle Verknüpfungen, die sich aus Abhängigkeiten einzelner Punkte ergeben, sind als gestrichelte Pfeile dargestellt. Aus den vier Hauptpunkten (graue Boxen), der Verfügbarkeit/Menge von Versuchstieren, ihrer Entwicklung und Funktionalisierung, sowie der Wahl der Technik zur Manipulation der Genexpression ergeben sich verschiedene Optionen und Kernpunkte (weiße Boxen). Die mit einer gestrichelten Linie umrahmten Punkte wurden in der vorliegenden Arbeit nicht in experimentellen Ansätzen berücksichtigt, sondern sollen die mit dem in Verbindung stehenden Hauptpunkt verfügbaren theoretischen Möglichkeiten aufzeigen. Aus den gegebenen Möglichkeiten wurden Knospen als Versuchsobjekte und RNA-Interferenz-basierte Techniken für die Genexpressionskontrolle ausgewählt (Details und Begründung siehe 2. Problemstellung) und erfordern die Betrachtung der weiteren mit ihnen in Verbindung stehenden Punkte.

### Auswahl der geeigneten Methode und Technik zur Genexpressionskontrolle.

Grundsätzlich stehen drei unterschiedliche Techniken der experimentellen Genexpressionskontrolle zur Verfügung: 1. Regulierung der Translation durch Morpholinos (Summerton & Weller 1997), 2. Manipulation der Translation durch RNA-Interferenz (Fire *et al.* 1998), 3. Erstellung von Überexpressions- oder Deletionsmutanten. Von den drei genannten Möglichkeiten wurde die Erstellung von transgenen Schwämmen aus den folgenden Gründen als ungeeignet ausgeschlossen: 1. Aufgrund des langsamen Wachstums der Schwämme würde die Etablierung von Deletions- und Überexpressionsmutanten sehr große Zeiträume in Anspruch nehmen, 2. Unter Laborbedingungen besteht kein Zugriff auf

Nachkommen aus sexueller Vermehrung, um reine transgene Schwammlinien herzustellen, 3. Die langen Etablierungszeiträume transgener Tierlinien bieten im Bezug auf die zu untersuchenden Gene eine geringere Flexibilität im Vergleich zu Morpholino- oder RNA-Interferenz-basierten Ansätzen. Die Morpholino- und RNA-Interferenz-basierten Ansätze stellen den Experimentator vor die Herausforderung des Einschleusens von siRNA, dsRNA bzw. Morpholinos in die Versuchstiere/Zellen. Dies kann in beiden Fällen entweder durch Mikroinjektion, Tränken in siRNA/dsRNA bzw. Morpholino-haltigem Medium oder Elektroporation geschehen (Tabara *et al.* 1998; Cerda *et al.* 2006). Elektroporations-basierte Protokolle zeigen im Allgemeinen verkürzte Überlebenszeiträume der Versuchstiere und sind in marinem Medium schwer zu realisieren (Hudziak *et al.* 1996; Preston *et al.* 2000). Daher wurden diese ebenfalls verworfen. Für RNA-Interferenz-basierte Ansätze scheidet das Tränken in siRNA/dsRNA-haltigem Medium aus, da es nicht möglich ist, RNase-freies marines Medium herzustellen. Morpholinos sind im Vergleich zu RNA aufgrund chemischer Modifikationen wesentlich stabiler und würden den Ansatz der Inkubation in Morpholino-haltigem Medium ermöglichen (Summerton & D.D. 1993). Die Mikroinjektion wird in der Regel auf Larven und Embryonen angewandt, welche im Fall von *T. wilhelma* nicht verfügbar sind, und kam daher nicht zur Anwendung. Stattdessen wurde ein Ansatz gewählt, der auf durch dsRNA-exprimierende Bakterien vermittelte RNA-Interferenz setzt. Hierbei handelt es sich um eine von Timmons (1998; 2001) entwickelte Methode zur Genexpressionskontrolle in *Caenorhabditis elegans* (MAUPAS, 1900), die auf der Fütterung der Versuchstiere mit dsRNA-exprimierenden Bakterien beruht, und zugleich die schonendste Methode zur Einbringung der dsRNA zur Genexpressionskontrolle darstellt.

**Verfügbarkeit von Versuchstieren.** Funktionelle genomische Untersuchungen erfordern den Zugang zu einer großen Zahl von Individuen. Aufgrund des relativ langsamen Wachstums von Schwämmen (Reiswig 1973; Ayling 1983) sind derartige Untersuchungen an adulten Individuen schwierig. Es wäre daher vorteilhaft, auf Jungschwämme zurückgreifen zu können, da diese in größerer Zahl verfügbar sind. Als Jungschwämme werden solche Individuen betrachtet, die sowohl morphologisch wie auch funktionell adulten Schwämmen äquivalent sind, jedoch noch eine deutlich geringere Größe aufweisen. Hier erwies sich die Schwammart *T. wilhelma* als sehr geeignet, da sie unter Laborbedingungen sehr einfach in kleinen Aquarien zu halten ist und sich regelmäßig und kontinuierlich über das ganze Jahr durch Knospenbildung asexuell vermehrt. Dies ermöglicht nicht nur den Zugang zu einer großen Zahl von Individuen, sondern bietet auch den Vorteil, dass es sich bei den Untersuchungsobjekten um natürliche Klone handelt, die somit auf genetischer Ebene identisch und vergleichbar sind.

**Detaillierte Kenntnis der Entwicklung.** Die agametische asexuelle Vermehrung in Schwämmen wurde bisher immer auf das hohe Regenerationspotenzial der Poriferen zurückgeführt und galt als wenig geordnet, da keine eindeutigen räumlich-zeitlichen Muster anhand anatomischer Merkmale im Verlauf der Entwicklung beschrieben werden konnten (Wilson 1907; Bond & Harris 1992). Detaillierte anatomische Untersuchungen zur Knospenbildung und Entwicklung liegen bisher nur für wenige Arten vor (Maas 1901; De Vos 1965; Connes 1968; Boury-Esnault 1970; Saller 1990; Corriero & Scalera Liaci 1998; Ereskovsky & Tokina 2007). Eine genaue Kenntnis unterschiedlicher Entwicklungsstadien ist für funktionelle Untersuchungen im oben genannten Fall aber essenziell. Daher soll die Entwicklung der durch asexuelle agametische Vermehrung gebildeten Knospen von *T. wilhelma* anhand von 3D-morphometrischen Analysen von Synchrotronstrahlungsbasierten-Röntgen-Mikrotomografie-Daten untersucht und charakteristische Knospenstadien

anhand anatomischer Merkmale identifiziert werden. Im Verlauf der Knospenentwicklung sollen die frühesten funktionellen Stadien identifiziert werden, die somit Jungschwämme darstellen, und als funktionelle Vertreter in morphologischen, genetischen und physiologischen Untersuchungen dienen können.

**Funktionelle Aspekte der Versuchstiere.** Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Technik zur Genexpressionskontrolle mittels dsRNA-exprimierender Bakterien erfordert die Fähigkeit der Versuchstiere, Nahrungspartikel aktiv aufzunehmen (Weissenfels 1976, 1983; Leys & Eerkes-Medrano 2006). Voraussetzung hierfür ist ein funktionelles Kanalsystem. Bisherige Arbeiten zum Wasserleitungssystem von Porifern untersuchten zwar die funktionelle Anatomie in ausgewählten Arten und trugen speziell durch Modellierungen der Pumpaktivität zu einem tieferen Verständnis bei (Larsen & Riisgard 1994), doch fehlen noch immer genaue Untersuchungen zur dreidimensionalen Architektur des Kanalsystems, worauf Simpson (1984) in seinem Kompendium zur Biologie der Porifera hinwies. Wenig erforscht sind auch die Entwicklung und Anatomie des frühesten funktionalen Kanalsystems. Neben der dreidimensionalen quantitativen und qualitativen Untersuchung des funktionellen Kanalsystems auf zellulärer und makromorphologischer Ebene war daher auch die Identifikation des frühesten funktionellen Kanalsystems in *T. wilhelma* Ziel meiner Arbeit.

Im Kontext der genannten Problemstellungen wurde die Entwicklung von *T. wilhelma* Knospen mittels Synchrotronstrahlungsbasierter-Röntgen-Mikrotomografie untersucht und charakteristische Knospenstadien anhand anatomischer Merkmale definiert. Die Funktionalität der Knospen bzw. Jungschwämme wurde anhand von Fütterungsexperimenten, Wasserleitungssystem-Abgüssen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen in Kombination mit Zeitrafferstudien der Kontraktion bestimmt. Basierend auf diesen Vorarbeiten konnte ein Protokoll zur Genexpressionskontrolle mittels RNA-Interferenz, durch die Fütterung von dsRNA-exprimierenden Bakterien, in *T. wilhelma* etabliert werden.

### 3 Material und Techniken

#### 3.1 Versuchstiere und Kultivierung

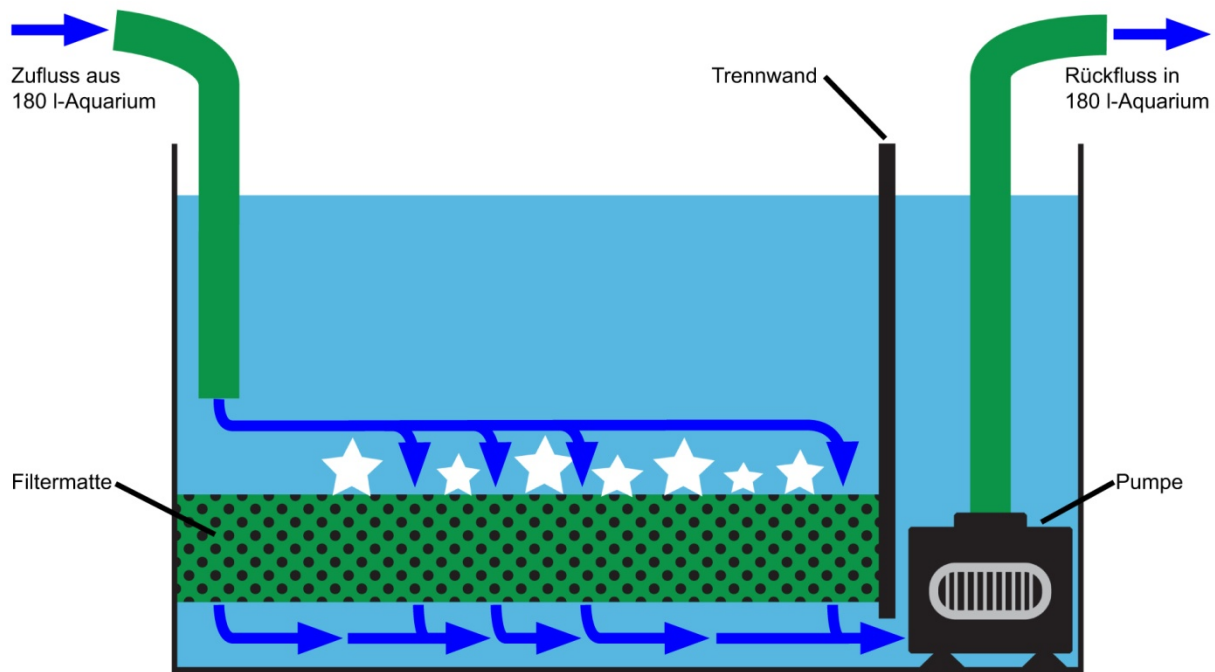
##### 3.1.1 Hälterung

Individuen von *T. wilhelma* wurden im Zoologisch-Botanischen Garten Wilhelma in Stuttgart gesammelt und nach Jena überführt. Über den gesamten Zeitraum der Arbeit hinweg erfolgte eine kontinuierliche Hälterung von *T. wilhelma* in tropischen Meerwasser-Aquarien des Instituts für Spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie (Friedrich-Schiller-Universität Jena). Hierfür stand ein 180 l fassendes Aquarium zur Verfügung, in dem die Schwämme bei 24 °C in künstlichem Meerwasser (Tropic Marine Meersalz) mit einer Salinität von 35 ‰ gehalten wurden. Es erfolgte eine künstliche Beleuchtung des Aquariums mit einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 h:12 h (Nickel 2004). In diesem Aquarium wurden die Schwämme einzeln in kleinen Glasschälchen gehalten, um das Fusionieren mehrerer Individuen zu verhindern (Nickel 2004) und um die Handhabung bei Entnahmen von adulten Individuen und Knospen, sowie während der Fütterung, zu vereinfachen. Die Fütterung erfolgte täglich mit *Artificial Plankton* (Aquakultur Genzel), einem Spezialfutter für Filtrierer mit einer Korngröße von 0,02-0,1 mm, das vor der Fütterung in ca. 80 ml Meerwasser suspendiert und mit einem Homogenisator (Ika T 10 basic ULTRA-TURRAX) mechanisch zerkleinert wurde. Die Nahrungssuspension wurde mit einer Pipette im Aquarium direkt in die für die Hälterung eingesetzten Glasschälchen gegeben. Während der Fütterung wurden sämtliche Filter im Aquarium für 15 min abgeschaltet, um ein zu schnelles Entfernen der Nahrungspartikel aus dem Wasser zu verhindern.

##### 3.1.2 Gewinnung und Aufzucht von Knospen

Speziell für die Aufzucht von Knospen und Jungschwämmen standen zwei weitere 20 l-Aquarien zur Verfügung, die mit dem 180 l-Aquarium über einen geschlossenen Wasserkreislauf in Verbindung standen. Die beiden Aquarien unterschieden sich im Wesentlichen in den Strömungsverhältnissen. Während in einem der Aquarien eine möglichst geringe Strömung eingestellt wurde, herrschten im zweiten sehr gleichmäßige Strömungsverhältnisse vor. Das Aquarium wurde hierfür wie folgt eingerichtet: Durch eine vertikale Trennwand, die ca. 2 cm über dem Aquarienboden eingebracht wurde, erfolgte eine Zweiteilung des Aquariums in einen Kultivierungsbereich und einen Pumpbereich. Im Kultivierungsbereich wurde horizontal eine Filtermatte eingebracht, die durch 2 cm hohe Abstandshalter vom Aquarienboden getrennt war. Der Zustrom von Wasser aus dem 180 l-Aquarium erfolgte in den Kultivierungsbereich, während aus dem Pumpbereich das Wasser in das 180 l-Aquarium zurückgeführt wurde, sodass durch die Filtermatte eine kontinuierliche Strömung über den gesamten Kultivierungsbereich gegeben war (Abbildung 8). Die juvenilen Schwämme und Knospen wurden zur Kultivierung direkt auf die Filtermatte im Kultivierungsbereich gesetzt.

Das Aquarium mit geringen Strömungsverhältnissen wurde vorwiegend für die Gewinnung von Knospen genutzt. Adulte, knospende Individuen von *T. wilhelma* wurden einzeln in Glasschälchen in dieses Aquarium eingesetzt, sodass die abgelösten Knospen nicht durch die Strömung verdriftet oder in den Filter gesaugt werden konnten, sondern sich in den Glasschälchen sammelten. Die vom Mutterschwamm abgelösten Knospen wurden zu



**Abbildung 8:** Aufzucht-aquarium für juvenile Schwämme. Das Aquarium wurde durch eine Trennwand in einen Kulturbereich und einen Pumpbereich unterteilt. In den Kulturbereich wurde horizontal eine Filtermatte eingebracht, auf die die juvenilen Schwämme gesetzt wurden. Durch die Unterteilung und die horizontal eingebrachte Filtermatte wurden gleichmäßige Strömungsverhältnisse im gesamten Kulturbereich erzeugt. Die Fließrichtung des Wassers ist durch die dunkelblauen Pfeile angedeutet.

mehreren in neue Glasschälchen überführt und im selben 20 l-Aquarium kultiviert, bis sie sich in den Glasschälchen festgesetzt hatten. Für die weitere Kultivierung wurden die Jungschwämme entweder in Glasschälchen in das 180 l-Aquarium oder in das zweite 20 l-Aquarium mit gleichmäßigen Strömungsverhältnissen umgesetzt. Die Knospen und juvenilen Schwämme wurden täglich mit demselben Futter wie adulte Individuen gefüttert.

## 3.2 Röntgen-Mikrotomografie

### 3.2.1 Probenvorbereitung für die Synchrotronstrahlungsbasierte Röntgen-Mikrotomografie (SR- $\mu$ CT)

Knospen (Tabelle 1 Proben A-J, L) wurden unmittelbar nach dem Sammeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einer Gefriersubstitutionsanlage (Leica AFS) mit Methanol + 1 %  $\text{OsO}_4$  + 2,5 % Glutaraldehyd + 2,5 %  $\text{ddH}_2\text{O}$  dem folgenden Temperaturprogramm unterzogen (modifiziert nach Nickel *et al.* 2006b). Die Proben wurden zunächst für 8 h bei  $-80^\circ\text{C}$  inkubiert und dann über einen Zeitraum von 2 h auf  $-60^\circ\text{C}$  erwärmt und weitere 8 h inkubiert. Es folgte eine weitere Erhöhung der Temperatur mit  $10^\circ\text{C/h}$  auf  $-30^\circ\text{C}$ , gefolgt von einem weiteren Inkubationsschritt von 8 h. Die Temperatur wurde im Anschluss an diesen Inkubationsschritt mit  $10^\circ\text{C/h}$  weiter erhöht, bis die Probe abschließend für 2 h bei  $0^\circ\text{C}$  inkubiert wurde. Es erfolgte ein zweimaliger Waschschrift für 10 min in Methanol, bevor die Proben in Aceton überführt und in einem Emitech K850 CPD System Kritischpunkt-getrocknet wurden. Für die Röntgen-Mikrotomografie wurden die Proben mit Zweikomponentenkleber oder zweiseitigem Klebeband auf einem Probenhalter fixiert.



Alternativ wurden Juvenile Exemplare von *T. wilhelma* (Tabelle 1 Probe M) unmittelbar nach der Entnahme aus dem Aquarium in 1,25 % Glutaraldehyd in steril filtriertem Meerwasser bei 4 °C über Nacht fixiert. Die Glutaraldehyd-Fixierlösung wurde mit einem Osmometer (Löser Mikro-Osmometer Typ OM 806) isoosmolar auf das direkt vor der Fixierung aus dem Aquarium entnommene Meerwasser eingestellt. Die Proben wurden mit einer 1 %  $\text{OsO}_4$ -Lösung in steril filtriertem Meerwasser, die mit Saccharose isoosmolar eingestellt wurde, kontrastiert. Hierfür wurden die Proben mit der Osmium-Lösung für 1,5 h auf einem Schüttler inkubiert. Über eine aufsteigenden Alkoholreihe bis 99,9 % Ethanol wurden die Proben anschließend entwässert. Für das kritischpunkt-trocknen in einem Emitech K850 CPD System wurden die Proben in Aceton überführt und für die Röntgen-Mikrotomografie mit Nagellack auf einem Probenhalter fixiert.

### 3.2.2 Kanalsystemabgüsse (*Corrosion Casts*)

Um Abgüsse des Kanalsystems (Tabelle 1 Probe K) zu erhalten, wurde adulten Individuen von *T. wilhelma* im Aquarium unter Wasser mit einer Kanüle Sekundenkleber (Patex) in das Osculum injiziert, bis ein Teil des Sekundenklebers wieder an anderer Stelle aus den Ostia austrat. Nachdem der Kleber ausgehärtet war, wurden die Schwämme aus dem Aquarium entnommen, in 99,9 % Ethanol überführt, und anschließend in Natriumhypochlorit ( $\text{NaOCl}$ ) mazeriert bis das Schwammgewebe vollständig von den Kanalabgüssen gelöst war. Die Abgüsse wurden getrocknet und für die Mikrotomografie mit Zweikomponentenkleber auf Probenhalter aufgebracht.

### 3.2.3 Synchrotronstrahlungsbasierte Röntgen-Mikrotomografie

Die röntgen-mikrotomografischen Untersuchungen wurden an den Beamlines BW2 und W2 des Speicherrings DORIS III am Deutschen Elektronen-Synchrotron DESY (Hamburg) unter Verwendung monochromatischer Röntgenstrahlung und einer Tomografieapparatur des GKSS Forschungszentrums durchgeführt (Beckmann *et al.* 2004; Beckmann *et al.* 2008). Es wurden 720 Radiogramme im gleichen Abstand zwischen 0 und  $\pi$  mit einer durchschnittlichen Belichtungszeit von 9,5 s (Knospen) bzw. 1,3 s (Kanalabgüsse) aufgenommen (Details siehe Tabelle 1). Aus den Radiogrammen wurden am GKSS Forschungszentrum Bildstapel von  $\geq 1024$  Bilder mittels des tomografischen Rekonstruktionsalgorithmus „back projection of filtered projections“ berechnet (Huesman *et al.* 1977).

**Tabelle 1: Experimentelle Einstellungen an der DESY-Beamline HASYLAB BW2/ W2 für die Synchrotronstrahlungsbasierte-Röntgen-Mikrotomografie**

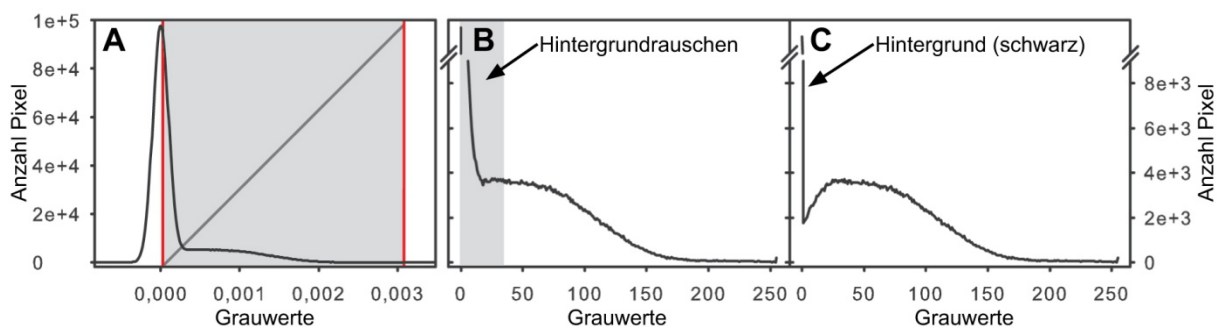
Probe ( <i>T. wilhelma</i> )	Datensatz ID	xyz-Dimension (Voxel)	xy-Pixelgröße ( $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ )	z-Abstand ( $\mu\text{m}$ )	Auflösung ( $\mu\text{m}$ )	Photonenenergie (keV)
A	2006a-usb14a	1536·1536·681	1,5	1,5	3,0	12,5
B	2006a-usb15a	1536·1536·418	1,5	1,5	3,0	12,5
C	2007h-usb08a	1536·1536·690	1,4	1,4	3,9	11,0
D	2006a-usb13a	1536·1536·629	1,5	1,5	3,0	12,5
E	2007h-usb03a	1536·1536·409	1,4	1,4	3,9	11,0
F	2007h-usb04a	1536·1536·327	1,4	1,4	3,9	11,0
G	2007h-usb05a	1536·1536·358	1,4	1,4	3,9	11,0
H	2007h-usb06a	1536·1536·334	1,4	1,4	3,9	11,0
I	2007h-usb07a	1536·1536·631	1,4	1,4	3,9	11,0
J	2007h-usb02a	1536·1536·764	1,4	1,4	3,9	11,0
K	2004-usb05ab	1536·1536·1187	2,9	2,9	-	11,5
L	2006a-usb02a	1536·1536·721	3,8	3,8	5,7	14,5
M	2009c-pnl37ab	1528·1528·1400	1,6	1,6	3,3	24,0

### 3.3 Bildverarbeitung

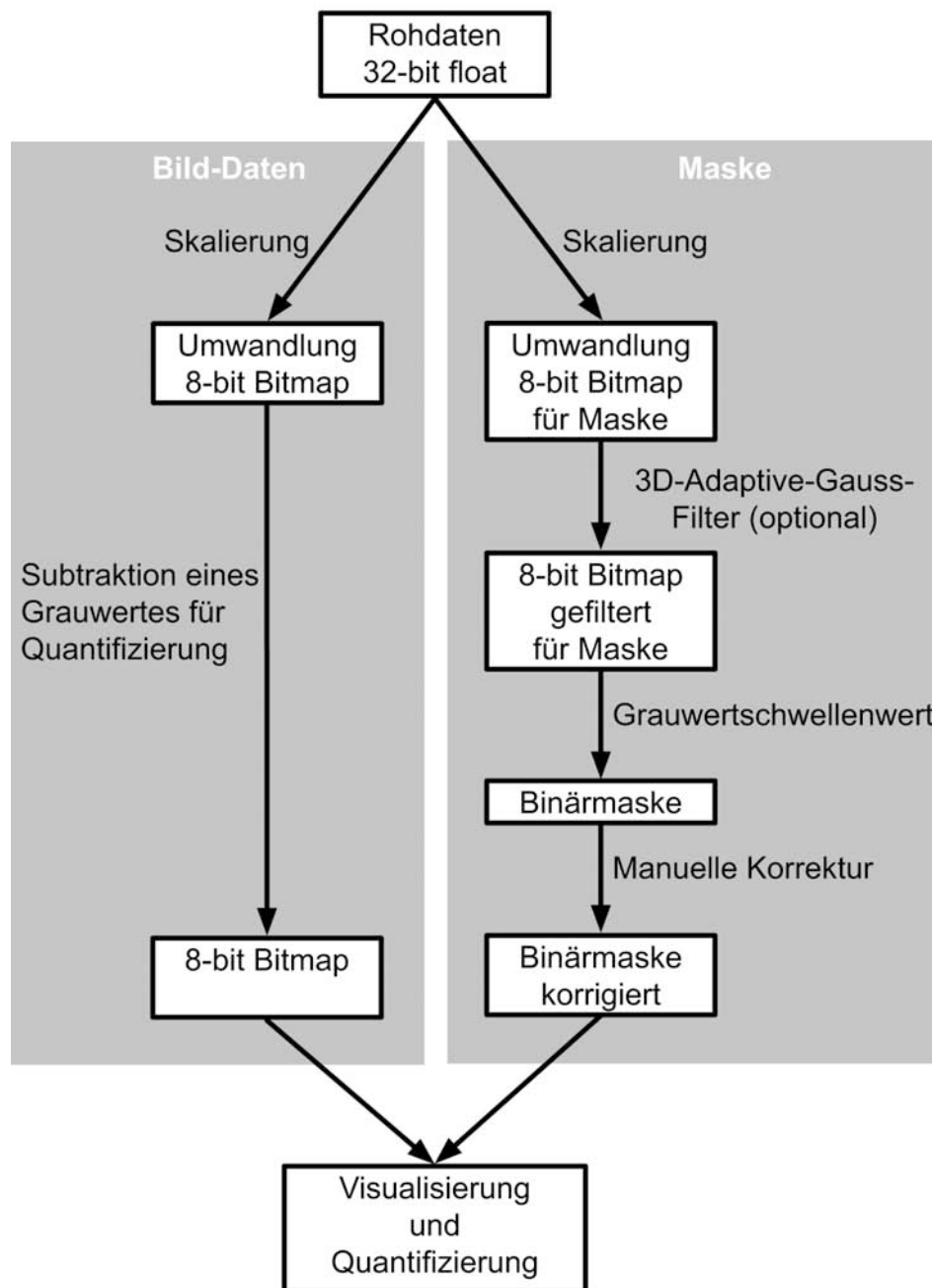
#### 3.3.1 Bildverarbeitung für Analysen zur Knospenentwicklung

Alle Bildverarbeitungsschritte erfolgten mittels der Bildverarbeitungssoftware *ImageJ* (Rasband 1997-2010), mit Ausnahme spezieller Filtertechniken auf die im Text gesondert hingewiesen wird. Um die große Anzahl an Bildern schneller verarbeiten zu können, wurden für die einzelnen Arbeitsschritte Makros erstellt, die eine semiautomatische Bearbeitung ganzer Bildstapel aus einem Verzeichnis heraus ermöglichten. Die Makros sind in Anhang 2 auf der Daten-CD hinterlegt.

Die Bilder der SR- $\mu$ CT-Rohdatensätze wurden anhand der folgenden Bildverarbeitungsschritte für die Visualisierung und quantitative Auswertung vorbereitet (vgl. Abbildung 10): Ausgehend von den 32-bit Fließkomma-Rohdaten wurden durch Skalierung und Umwandlung in 8-bit Bitmap-Bildstapel für jeden Datensatz zwei unterschiedliche Versionen generiert, die einmal für die Quantifizierung und einmal für die Erstellung einer Maske optimiert wurden (Makro 1, Anhang 2). Unter Skalierung soll hier die Erstellung eines neuen Bildes basierend auf der Auswahl bestimmter Grauwerte aus dem Histogramm verstanden werden (Abbildung 9A). Der Skalierungsschritt beinhaltet auch eine Umwandlung der Daten aus dem 32-bit Fließkomma-Format in das 8-bit Bitmap-Format und erfordert damit die Verteilung der ausgewählten Grauwerte aus den Rohdaten auf 256 unterschiedliche Grauwerte des 8-bit Formates (Abbildung 9B). Für die Auswahl der Grauwerte wurden die folgenden Kriterien angewandt: Im Falle der Skalierung der Datensätze für die Quantifizierung wurde versucht, diejenigen Grauwerte des Histogramms auszuwählen, die in der untersuchten Probe auftreten, wobei ein Verschmelzen von hellen Grauwerten im Bereich der hochabsorbierenden Skelettelemente in Kauf genommen wurde, da hier auf eine weitere Differenzierbarkeit für die nachfolgenden Analysen verzichtet werden konnte. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass keine Informationen im angrenzenden Grauwertbereich, der Weichgewebe repräsentiert, verloren gingen. Die untere Grauwertgrenze, die die Schwelle zwischen Hintergrundrauschen und Weichgewebe darstellt, wurde so gewählt, dass ein möglichst großer Unterschied zwischen den beiden Bereichen gegeben war. Dabei wurde darauf geachtet, dass durch das verringerte Grauwertintervall keine



**Abbildung 9:** Beispiel Histogramme zur Skalierung von SR- $\mu$ CT Daten. (A) Histogramm eines 32-bit Fließkomma-Rohdaten-Schnittbildes. Grau unterlegt ist der Grauwertebereich, der für die Skalierung ausgewählt wurde. Für die Visualisierung in 3D-Renderings wurde ein Rampen-Filter angewandt, der die Transparenz der jeweiligen Grauwerte bestimmt (graue Linie im durch rote Balken begrenzten Intervall). Dunkle Grauwerte (links im Histogramm) sind transparent dargestellt, helle Grauwerte (rechts im Histogramm) nicht transparent. (B) Histogramm des skalierten 8-bit Bitmap Schnittbildes. Grau unterlegt sind Grauwerte, die zum Hintergrundrauschen beitragen. (C) Histogramm des skalierten 8-bit Bitmap Schnittbildes, nachdem es mit einer Maske verrechnet wurde, um das Hintergrundrauschen zu entfernen. Der einheitlich schwarze Hintergrund zeigt sich als Peak im Histogramm bei einem Grauwert von 0.



**Abbildung 10:** Schema der Bildverarbeitungsschritte von SR- $\mu$ CT Daten für die quantitative und qualitative Bildanalyse von *T. wilhelma*-Knospen (Details und Erläuterungen siehe 3.3.1 Bildverarbeitung für Analysen zur Knospenentwicklung).

Informationen im Bereich des Weichgewebes, aufgrund der Zusammenfassung von Grauwertinformationen durch die Umwandlung des ausgewählten Grauwertintervalls aus dem 32-bit Fließkomma- in das 8-bit Bitmap-Format, verloren gingen. Für die Erstellung einer Maske, die zur Entfernung des Hintergrundrauschens aus den zu untersuchenden Datensätzen genutzt werden sollte, wurde die Skalierung daraufhin optimiert, in den Datensätzen einen möglichst großen Unterschied zwischen Rauschen und untersuchtem Objekt zu erhalten. In diesem Fall wurde nicht darauf geachtet, ob in den Bilddaten Informationen innerhalb des untersuchten Objektes verloren gingen. In Abhängigkeit des Rauschverhältnisses wurden die Datensätze, die für die Erstellung der Maske vorgesehen waren, einem Filterschritt mit einem 3D-adaptive-Gauss Filter in der Software *VGStudioMax* (64 bit-Version 2.0, VolumeGraphics GmbH) unterzogen. Dieser Schritt kam zum Einsatz,

wenn im Skalierungsschritt der Rohdaten für die Erstellung der Maske keine gute Trennung der Grauwerte zwischen Hintergrundrauschen und Objekt erzielt werden konnte. Die weiteren Bildverarbeitungsschritte erfolgten in *ImageJ*. Über einen Grauwertschwellenwert wurden die Bildstapel mithilfe eines Makros (Makro 2, Anhang 2) in Binärbilder umgewandelt, die Objekt und Hintergrund klar trennen. Einzelne, außerhalb des Objektes verbliebene Pixel in den Binärbildern wurden entweder durch einen Rauschfilter (Despeckle-Filter), der einzelne Pixel entfernt, oder durch wiederholte Erosions- und Dilatationsoperationen entfernt. Der letzte Bildverarbeitungsschritt beinhaltete die Kontrolle und gegebenenfalls eine manuelle Korrektur der automatisch erstellten Masken anhand eines Vergleiches mit den entsprechenden Schnittbildern des Bilddatensatzes und einer anschließenden Verrechnung der Maske mit dem für die Quantifizierung skalierten Bildstapel (Abbildung 9C). Vor der Verrechnung der beiden Bildstapel miteinander wurde von den für die Quantifizierung skalierten Schnittbildern ein Grauwert abgezogen, um in der Quantifizierung den Hintergrund von allen im Untersuchungsobjekt enthaltenen Grauwerten unterscheiden zu können (Makro 3, Anhang 2). Alle Bildverarbeitungsschritte wurden protokolliert und mit den Originaldaten und Ergebnissen der Teilschritte archiviert.

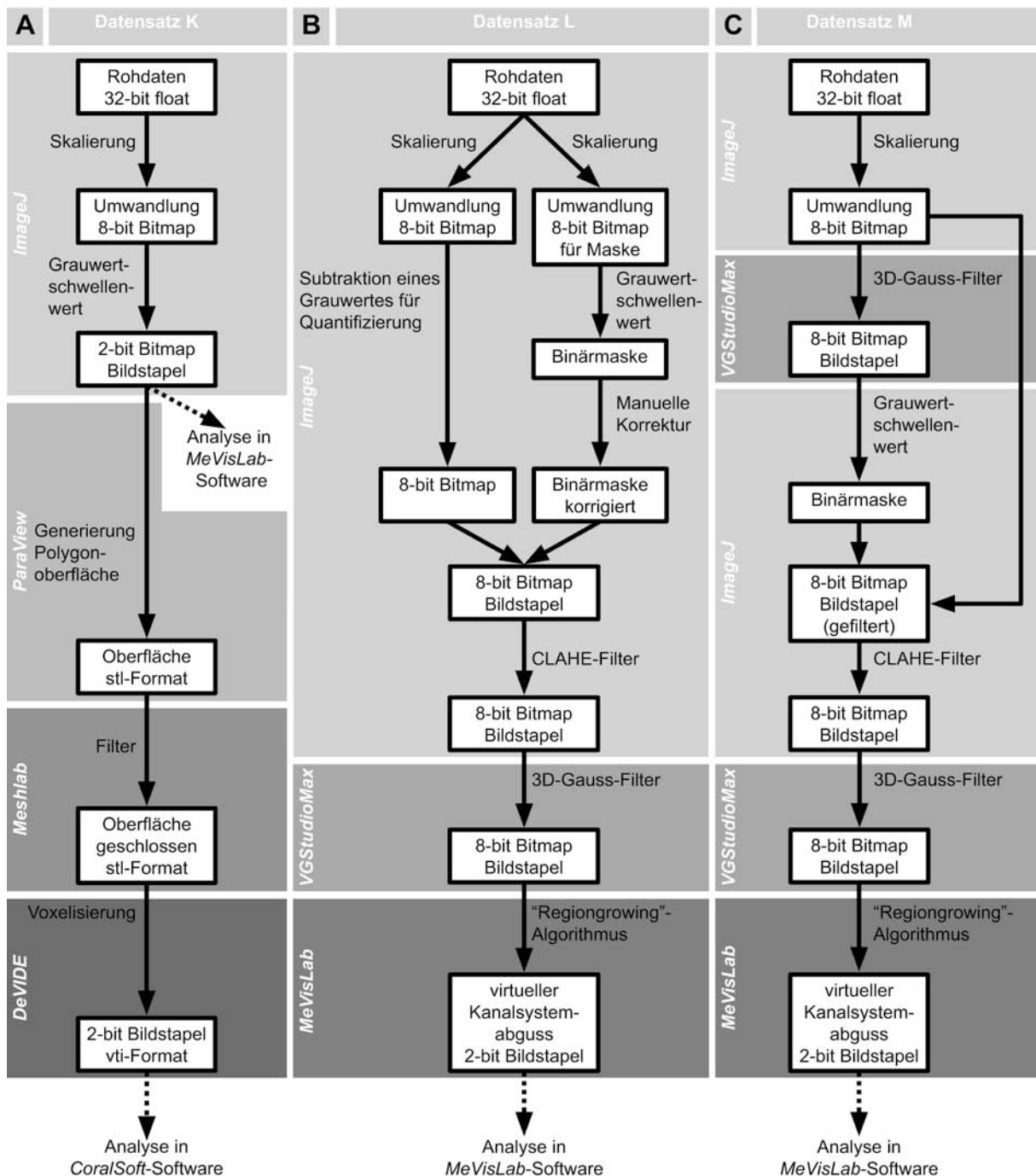
### 3.3.2 Bildverarbeitung für Analysen des Wasserleitungssystems

Die drei untersuchten Datensätze wurden aufgrund unterschiedlicher Signal-zu-Rausch-Verhältnisse individuellen Bildverarbeitungsschritten unterzogen.

#### Datensatz K (Tabelle 1) - *T. wilhelma* (adult) Kanalsystemabguss

Ausgehend von den SR- $\mu$ CT 32-bit Fließkomma-Rohdaten wurde entsprechend Abschnitt 3.3.1 durch Skalierung und Umwandlung in einen 8-bit Bitmap-Bildstapel ein Datensatz mit sehr geringem Hintergrundrauschen generiert (Makro 1, Anhang 2). Bei der Auswahl des Grauwertintervalles für die Skalierung wurde versucht, die im Hintergrundrauschen enthaltenen Grauwerte auszuschließen und ein möglichst hohes Kontrastverhältnis zum Kanalsystemabguss zu erhalten. Der Kanalsystemabguss selbst enthielt keine weiteren auf unterschiedlichen Röntgenabsorptionen basierenden Informationen, sodass nicht auf Informationsverlust durch Zusammenfallen von Grauwerten durch die Skalierung geachtet werden musste. Die skalierten 8-bit Bitmap-Schnittbilder wurden basierend auf einem Grauwertschwellenwert in Binärbilder umgewandelt. Im Datensatz verbliebenes Rauschen, das sich in Form einzelner Pixel darstellt, wurde durch einen Rauschfilter (Despeckle-Filter) entfernt (Abbildung 11A). Alle Bildbearbeitungsschritte erfolgten in der Software *ImageJ*. Der so erhaltene binäre Volumendatensatz wurde für die quantitativen Analysen in der Software *MeVisLab* (entwickelt von der MeVis Medical Solutions AG und Fraunhofer MEVIS) verwendet.

Für quantitative Analysen mit der in der Arbeitsgruppe von Jaap Kaandorp (Universität van Amsterdam) entwickelten Software *CoralSoft* (Kruszyński *et al.* 2007) wurde der binäre Volumendatensatz wie folgt vorbereitet: In der Software *ParaView 3.8* (Kitware) wurde ein Polygon-Oberflächendatensatz des Kanalsystemabgusses erstellt und im stl-Format abgespeichert. Die Anzahl der Polygone, die für die Darstellung der Oberfläche benötigt wurden, wurde mittels eines Filters soweit reduziert, bis keine weiteren Polygone mehr entnommen werden konnten, ohne die Oberfläche zu verändern. In der Software *Meshlab v1.2.2* wurden eventuell in der Oberfläche entstandene Löcher im Polygonnetzwerk



**Abbildung 11:** Schema der Bildverarbeitungsschritte von SR- $\mu$ CT Daten für die quantitative und qualitative Bildanalyse des Wasserleitungssystems (Details und Erläuterungen siehe 3.3.2 Bildverarbeitung für Analysen des Wasserleitungssystems).

geschlossen. Mithilfe der Entwicklungsumgebung *DeVIDE* (Delft Visualisation and Image processing Development Environment, Botha & Post 2008) wurde der Datensatz durch Voxelisierung aus dem stl-Format in das vti-Format konvertiert, welches als Eingabeformat für die Software *CoralSoft* diente (Abbildung 11A).

#### Datensatz L (Tabelle 1) – *T. wilhelma* (adult) virtueller Kanalsystemabguss

Die SR- $\mu$ CT Rohdaten des Datensatzes L wurden entsprechend der Bildverarbeitungsschritte der Datensätze für die Analysen zur Knospenentwicklung bearbeitet (siehe Abschnitt 3.3.1). Um einen größeren Kontrastunterschied zwischen Kanalsystemelementen und den übrigen

Schwammstrukturen zu erhalten wurde auf den so erhaltenen Datensatz ein Filter zur lokalen kontrastabhängigen Kontrasterhöhung angewandt (CLAHE-Filter: „Contrast limited adaptive histogram equalization“), der von Stephan Saalfeld (Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) als *ImageJ* Plugin<sup>2</sup> implementiert wurde. Hierfür wurde ein Makro in *ImageJ* erstellt, das die automatische Verarbeitung eines Bildstapels aus einem Verzeichnis heraus mit dem CLAHE-Filter ermöglicht (Makro 4, Anhang 2). Auf den gefilterten Datensatz wurde ein 3D-Gauss-Filter in *VGStudioMax* angewandt, um das in den Kanalsystemelementen enthaltene Rauschen zu reduzieren. Mithilfe eines „Region-Growing“-Algorithmus wurde in der Software *MeVisLab*, ausgehend von ca. 5300 Startpunkten und einem Grauwertintervall, welches die Grauwertbereiche der Kanalsystemelemente umfasste, ein virtueller Kanalsystemabguss erstellt und als binärer Volumendatensatz gespeichert (Abbildung 11B). Dieser wurde für die quantitativen Analysen in der Software *MeVisLab* eingesetzt.

### **Datensatz M (Tabelle 1) – *T. wilhelma* (Jungschwamm) virtueller Kanalsystemabguss**

Die SR- $\mu$ CT 32-bit Fließkomma-Rohdaten des Datensatzes M wurden mithilfe des Makro 1 (Anhang 2) in *ImageJ* skaliert und in einen 8-bit Bitmap-Bildstapel umgewandelt. Bei der Skalierung wurde darauf geachtet, möglichst viele Grauwerte, die im Hintergrundrauschen enthalten waren, zu entfernen, um einen großen Kontrastunterschied der Kanalsystemelemente zu den übrigen Schwammstrukturen zu erhalten. Es folgte ein Filterschritt mit einem 3D-Gauss-Filter in *VGStudioMax*. Dieser Datensatz wurde genutzt, um in *ImageJ* durch Anwendung eines Grauwertintervalles eine Binärmaske zu erstellen. In den Schnittbildern verbliebenes Rauschen, sichtbar in Form einzelner Pixel, wurde mit einem Rauschfilter entfernt. Der so erhaltene Masken-Datensatz wurde in *ImageJ* mit dem aus den Rohdaten erstellten, skalierten Datensatz verrechnet, um das die Probe umgebende Hintergrundrauschen zu entfernen. Um einen größeren Kontrastunterschied zwischen Kanalsystemelementen und den übrigen Schwammstrukturen zu erhalten, wurde in *ImageJ* der CLAHE-Filter auf den Datensatz angewandt (Makro 4, Anhang 2). Der Datensatz wurde anschließend einem 3D-Gauss-Filter in *VGStudioMax* unterzogen, um das in den Kanalsystemelementen enthaltene Rauschen zu reduzieren. Mithilfe eines "Region-Growing"-Algorithmus (Blum 1973; Boskamp *et al.* 2005) wurde in der Software *MeVisLab*, ausgehend von ca. 4000 Startpunkten und einem Grauwertintervall, welches die Grauwertbereiche der Kanalsystemelemente umfasste, ein virtueller Kanalsystemabguss erstellt und als binärer Volumendatensatz gespeichert (Abbildung 11C). Dieser wurde für die quantitativen Analysen in der Software *MeVisLab* eingesetzt.

### **3.3.3 Volume Rendering**

Bildstapel von kompletten Schwämmen, einschließlich derer interner morphologischer Strukturen (Skelett, Gewebe und Wasserleitungssystem), wurden in *VGStudioMax* unter Verwendung des „Scatter HQ“ Algorithmus gerendert. Die Segmentierung und Visualisierung aller morphologischen Strukturen erfolgte auf der Basis von Grauwertschwellen (vgl. 3.3.5). Die 3D-Daten wurden bei voller Auflösung von 1,4  $\mu\text{m}$  (Datensätze C, E-J), bzw. 1,5  $\mu\text{m}$  (Datensätze A-B, D) Voxelgröße gerendert.

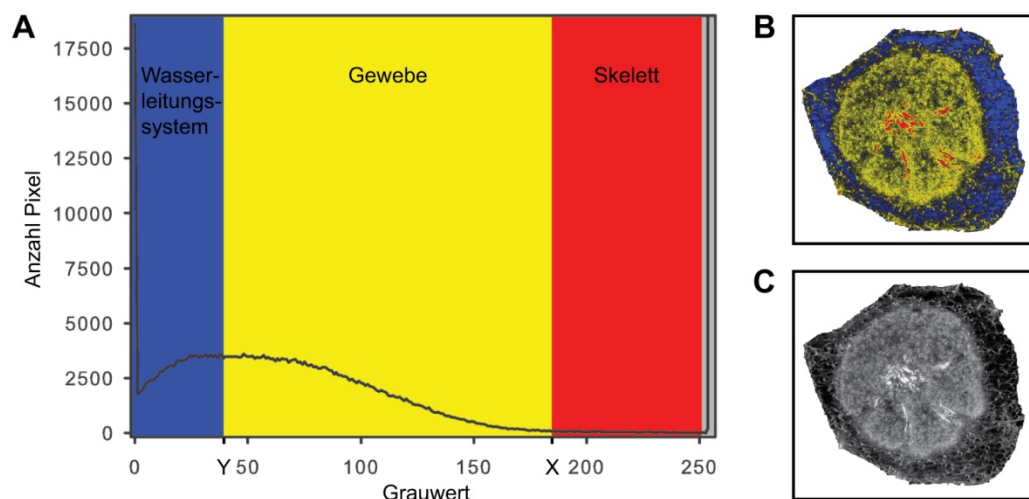
<sup>2</sup> [http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Enhance\\_Local\\_Contrast\\_\(CLAHE\)](http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Enhance_Local_Contrast_(CLAHE))

### 3.3.4 Volume Renderings des Wasserleitungssystems

Kanalsystemabgüsse und virtuelle Kanalsystemabgüsse wurden in *VGStudioMax*, basierend auf rekonstruierten und segmentierten Bilddatensätzen unter Verwendung des „Scatter HQ“ Algorithmus, gerendert. Für kombinierte Ansichten von Kanalsystemabgüssen, die ebenfalls die Mittellinien der Kanäle des Wasserleitungssystems zeigen, wurden die in *MeVisLab* berechneten Mittellinien der Kanäle als binäre Volumendatensätze exportiert und in *VGStudioMax* importiert. Die 3D-Daten wurden bei voller Auflösung von 2,9  $\mu\text{m}$  (Datensatz K), 3,8  $\mu\text{m}$  (Datensatz K) bzw. 1,6  $\mu\text{m}$  (Datensatz M) Voxelgröße gerendert.

### 3.3.5 Quantitative Bildanalyse für die Knospenentwicklung

Volumenmessungen wurden nach Nickel (2006b) an bearbeiteten und segmentierten Bildstapeln mit *ImageJ* durchgeführt (vgl. 3.3.1). Die Klassifizierung der anatomischen Strukturen erfolgte anhand von Grauwertschwellen im 256 Grauwerte umfassenden Histogramm der 8-bit Bitmap-Bildstapel. Hoch absorbierende Strukturen, wie Skelettelemente, finden sich am oberen Ende der Grauwertskala, sodass sich das gewählte Intervall von X bis 254 erstreckte (Abbildung 12). Die Bereiche des Wasserleitungssystems zeigen nur eine sehr geringe Röntgenabsorption, da sie in den getrockneten Proben luftgefüllt sind und finden sich daher am unteren Ende der Grauwertskala in einem Intervall von 0 bis Y (Abbildung 12). Die Mesohylbereiche und Zellen weisen eine Absorption dazwischen auf und finden sich dementsprechend im Intervall von Y bis X (Abbildung 12). Für jedes der funktionalen morphologischen Elemente wurden jeweils drei unterschiedliche Klassifikationen verwendet, die jeweils eine möglichst genaue Bestimmung, sowie eine Über- und Unterschätzung darstellten. Anschließend wurde aus den drei Messungen der Mittelwert gebildet, um Klassifikationsfehler zu reduzieren. Die Volumina wurden durch Summierung der Volumenmessungen aller Bilder im Stapel berechnet. Die Datensätze wurden dreimal unabhängig entlang jeder der drei Hauptachsen des Bilddatensatzes analysiert um Fehler



**Abbildung 12:** (A) Histogramm eines Schnittbildes aus einem SR- $\mu$ CT Datensatz für die quantitative Bildanalyse der Knospenentwicklung. Farblich unterlegt sind Bereiche des Histogramms anhand derer morphologische Strukturen (Wasserleitungssystem- blau, Gewebe – gelb, Skelett - rot) klassifiziert wurden. Grau unterlegt ist der Bereich der im Schnittbild weißen Hintergrundpixel (vgl. B-C). (B) Schnittbild mit eingefärbten anatomischen Strukturen. Die Auswahl der gewählten Grauwertintervalle entspricht den in (A) dargestellten Bereichen. (C) Schnittbild des in (A) gezeigten Histogramms in original Grauwertdarstellung.

der Bildmasken auszumitteln (Nickel *et al.* 2006b). Um Knospen unterschiedlicher Größe miteinander vergleichen zu können, wurden relative Abstände zum Knospenzentrum in den Diagrammen verwendet. Die Volumina der einzelnen Strukturen wurden in Diagrammen als relativer Anteil des Gesamtvolumens der Individuen gegen den relativen Abstand vom berechneten Knospenzentrum aufgetragen.

### 3.3.6 Quantitative Bildanalyse des Wasserleitungssystems

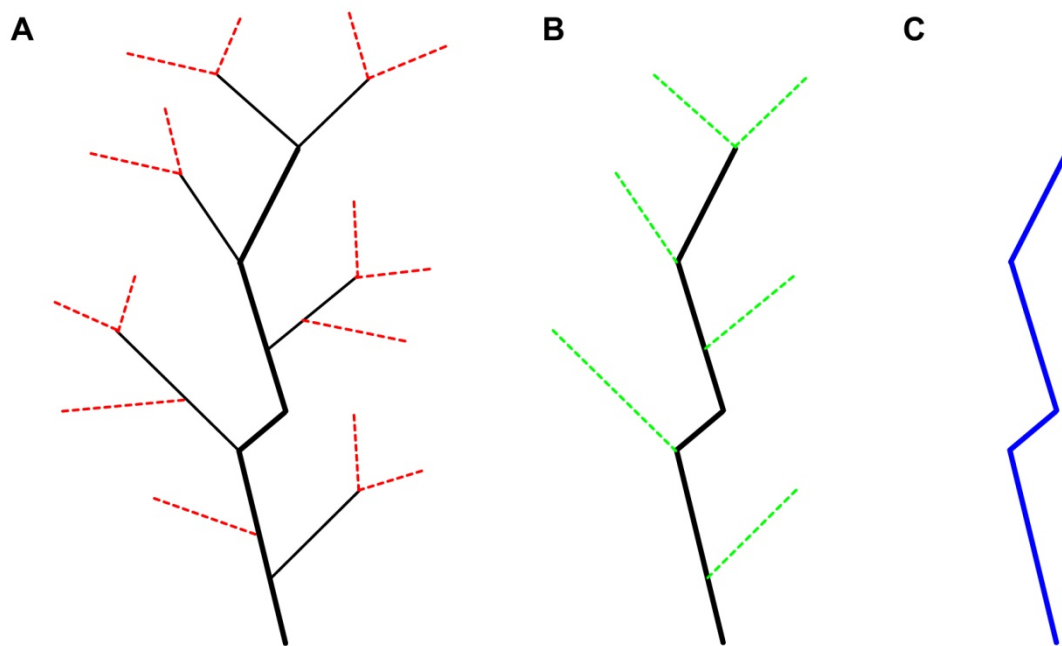
Messungen der Kanaldurchmesser wurden an den Datensätzen K-M (Tabelle 1) in der Software *MeVisLab* vorgenommen. Es wurde zunächst mithilfe eines Distance-Transform-Skeletonisierungs-Algorithmus die Mittellinie der Kanäle in den Volumendatensätzen berechnet. Hierfür werden in mehreren Iterationsschritten jeweils die Kantenvoxel des binären Datensatzes entfernt, bis eine ein Pixel dicke Mittellinie übrig bleibt. Die Topologie des ursprünglichen Datensatzes bleibt auf diese Weise erhalten. Ausgehend von der Mittellinie wurde automatisch der minimale Abstand zur Kanalwand bestimmt. Als Ergebnis wurde das berechnete Skelett des Wasserleitungssystems als Graph zusammen mit den Durchmessern der Kanäle in einer XML-Datei gespeichert. In der Graphendarstellung der Mittellinie repräsentieren die gespeicherten Knoten Verzweigungspunkte der Kanäle und Kanten die Kanäle selbst. Da in der ausgegebenen XML-Datei für einzelne Kanäle mehrere Messpunkte, je nach Länge der Kanäle, zur Verfügung standen, wurden diese für weitere Analysen gemittelt, sodass für jeden Kanal genau ein Messwert erhalten wurde. Für einen Teil des Datensatzes K (Tabelle 1) erfolgte eine Klassifizierung der Verzweigungshierarchien (Horton 1945; Abraham 2001) in *Excel* (Version 2007, Microsoft) unter Verwendung des Plugin *NodeXL* (Smith *et al.* 2009). Für dieses Subvolumen wurde iterativ mit *MatLab* (Version 2007R, Mathworks) der Parameter  $\Delta$  (Mandelbrot 1983) bestimmt, der definiert ist als:  $r_1^\Delta = r_2^\Delta + r_3^\Delta$ , wobei  $r_1$  der Kanaldurchmesser vor einer Verzweigung und  $r_2$  und  $r_3$  die Kanaldurchmesser nach einer Verzweigung darstellen.

Für den Datensatz K (Tabelle 1) erfolgte eine weitere Auswertung mit der Software *CoralSoft*, in der im ersten Schritt mit einem Skeletonisierungsalgorithmus von Xie (2003) die Mittellinie der Kanäle berechnet wurde. Sehr stark verwinkelte Abschnitte des Gerüsts wurden geglättet und kurze Seitenäste, die als Artefakt aufgrund der stark strukturierten Kanaloberfläche entstanden, entfernt. Ringstrukturen, die in der berechneten Mittelliniendarstellung des Datensatzes auftraten, wurden manuell entfernt, da diese die Hierarchieebenenbestimmung stören.

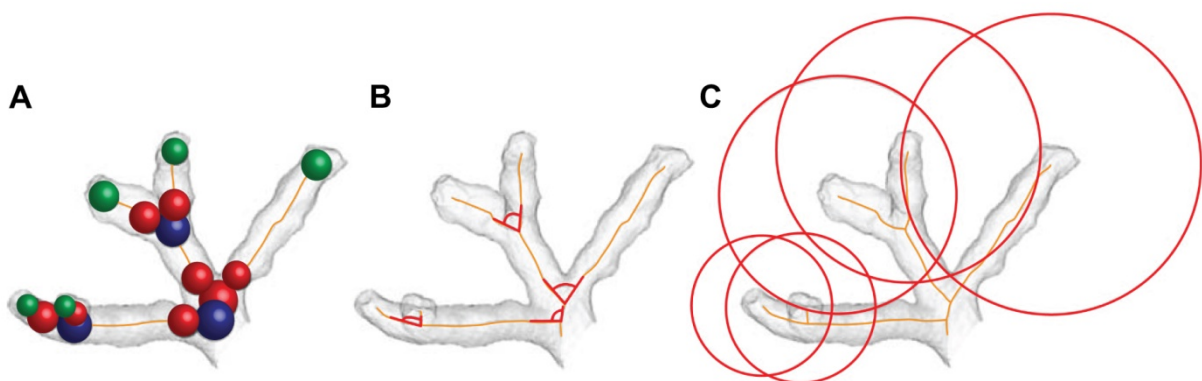
Die so erstellte Mittellinie des sich verzweigenden Objektes kann für die Bestimmung einer Reihe von Messungen genutzt werden. Unter anderem ermöglicht sie die Bestimmung von Verzweigungshierarchien (Horton 1945; Abraham 2001). Diese können mit einem Algorithmus definiert werden, indem man sich von den terminalen Ästen des sich verzweigenden Objektes in das Netzwerk hinein vorarbeitet. Zunächst wurde die Wurzel des sich verzweigenden Systems vorgegeben, im Falle des Kanalsystems von Schwämmen wurde hierfür das Osculum gewählt. Im nächsten Schritt ordnet man den terminalen Ästen die erste Hierarchieebene zu (Abbildung 13A), und entfernt sie anschließend aus dem Netzwerk. Es folgt ein zweiter Iterationsschritt, indem die neuen terminalen Äste der zweiten Hierarchieebene zugeordnet, und anschließend ebenfalls aus dem Netzwerk entfernt werden (Abbildung 13B). Dieser Schritt wird wiederholt bis keine Äste mehr übrig sind (Abbildung 13C). Im Anschluss wird das Netzwerk wieder zusammengesetzt und die Hierarchieebenen der einzelnen Äste sind nun bekannt. Korreliert mit der hierarchischen Klassifizierung der Kanäle wurden Kanaldurchmesser, Abstände benachbarter terminaler Kanäle und



Verzweigungswinkel berechnet. Ein Algorithmus bestimmt die Kanaldurchmesser durch Einpassen einer Kugel, deren Radius ausgehend von der Mittellinie immer weiter vergrößert wird, bis die Kugel an die Kanalwände stößt (Abbildung 14A). Die Kanaldurchmesser wurden an den Enden von terminalen Kanälen (grüne Kugeln, Abbildung 14A), an den Verzweigungspunkten (blaue Kugeln, Abbildung 14A) und direkt an die blauen Kugeln angrenzend (rote Kugeln, Abbildung 14a) bestimmt. Des Weiteren wurden die Verzweigungswinkel der Kanäle durch Bestimmung des Winkels zwischen den Mittellinien benachbarter Kanäle ermittelt (Abbildung 14B). Ebenfalls wurden die Abstände zwischen terminalen Kanälen ermittelt. Hierfür werden durch den Algorithmus, ausgehend von den Enden der Mittellinie Kugeln eingepasst, bis diese die Oberfläche eines benachbarten Kanales berühren (Abbildung 14C).



**Abbildung 13:** Horton-Strahler Klassifizierung. (A) Einfaches Netzwerk. Das Netzwerk in (B) erhält man, in dem alle terminalen Äste des Netzwerkes in (A) entfernt werden. Diese Äste werden als Segmente 1. Ordnung klassifiziert. Die neuen terminalen Äste in (B) werden als Segmente 2. Ordnung klassifiziert und entfernt. Damit ergeben sie in (C) ein Segment 3. Ordnung (verändert nach Kruszyński *et al.* 2007).



**Abbildung 14:** (A) Kanaldurchmesser an den Enden von terminalen Kanälen (grüne Kugeln), an den Verzweigungspunkten von Kanälen (blaue Kugeln) und Kanaldurchmesser nach Verzweigungspunkten direkt angrenzend an die blauen Kugeln (rote Kugeln). (B) Verzweigungswinkel zwischen den Mittelpunkten von blauen und roten Kugeln benachbarter Kanäle. (C) Abstände terminaler Kanäle, gegeben als Radius einer Kugel an der Spitze terminaler Kanäle (verändert nach Kruszyński *et al.* 2007).

### 3.4 Licht- und Elektronenmikroskopie

#### 3.4.1 Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie

Knospen von *T. wilhelma* wurden direkt nach der Entnahme aus dem Aquarium in einer Fixierlösung aus 0,45 M Natriumacetat-Puffer (pH 6,4 in filtriertem künstlichem Meerwasser) + 2 % OsO<sub>4</sub> + 2 % Glutaraldehyd + 0,29 M Saccharose für 30 min auf Eis inkubiert. Die Fixierlösung wurde erneuert und die Proben bei 4 °C über Nacht inkubiert. Durch sechs Waschschrte wurde die Fixierlösung entfernt. Hierfür wurden die Proben dreimal einer Inkubation für 10 min in steril filtriertem Meerwasser und dreimal für 10 min in Reinstwasser unterzogen. Die Proben wurden anschließend für 1 h in 5 % (v/v) Flusssäure in Reinstwasser desilifiziert. Auf die Desilifizierung folgten sechs Waschschrte jeweils für 10 min mit Reinstwasser. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis 99,9 % Ethanol entwässert, gefolgt von einer Einbettung in Styrolmethacrylat (modifiziert nach Weissenfels 1982a). Dies erfolgte durch Inkubieren der Proben in einer 1:1-Mischung (v/v) aus Ethanol und Styrolmethacrylat-Stammlösung auf einem Schüttler (4 x 30 min). Die Styrolmethacrylat-Stammlösung bestand aus einer 1:1-Mischung (v/v) von Styrol und Methacrylat mit 4 % (w/v) Benzoylperoxid. Anschließend wurden die Proben in Styrolmethacrylat-Stammlösung (4 x 30 min) auf einem Schüttler inkubiert. Es erfolgte ein Austausch der Styrolmethacrylat-Stammlösung in den Reaktionsgefäßen, bevor die Proben über Nacht auf einem Schüttler inkubiert wurden. Die Proben wurden einem ersten Polymerisationsschritt bei 48 °C für 48 h in einen Wärmeschrank unterzogen. Das vollständige Aushärten des Styrolmethacrylates erfolgte in einem zweiten Polymerisationsschritt bei 60 °C für 24 h. Anschließend wurden Semi-Dünnschnitte (2 µm) der Probe mit einem Mikrotom (Microm HM 360) angefertigt bis die gewünschte Schnittebene in der Probe erreicht war. Durch eine Behandlung mit Xylol wurde das Styrolmethacrylat aus der verbliebenen Probe herausgelöst und die Probe über eine ansteigende Alkoholreihe (Ethanol) entwässert. Für die Kritischpunkt-Trocknung in einem Emitech K850 CPD System wurden die Proben in zwei Schritten in Aceton überführt. Die getrockneten Proben wurden auf Probenhalter geklebt und in einem Emitech K500 SC System mit Gold bedampft.

#### 3.4.2 Rasterelektronenmikroskopische Histologie

Bei der rasterelektronenmikroskopischen Histologie handelt es sich um eine Technik, die es ermöglicht, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an einer einzigen Probe vorzunehmen (Weissenfels 1982a). Hierfür wurden die Proben wie unter 3.4.1 beschrieben vorbereitet, jedoch wurden die letzten 5 – 10 angefertigten Semi-Dünnschnitte für die DIC-Mikroskopie (Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie) in *Euparal* (Roth) eingedeckt. Da aus einer Probe sowohl Semi-Dünnschnitte für die Lichtmikroskopie wie auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zur Verfügung standen, konnten morphologische Strukturen auf dem zuletzt abgenommenen Semi-Dünnschnitt mit exakt den gleichen Strukturen auf der im Rasterelektronenmikroskop untersuchten Schnittfläche korreliert und verglichen werden. Auf diese Weise konnten die Vorteile beider Mikroskopietechniken genutzt und die aus den SEM-Aufnahmen erhaltenen räumlichen Informationen mit den aufgrund der höheren Auflösung detaillierteren Informationen zur Histologie aus der DIC-Mikroskopie kombiniert werden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Philips XL30ESEM Gerät und DIC-mikroskopische Aufnahmen an einem Olympus BH-2 Mikroskop mit einer Zeiss AxioCam und AxioVision Software (Version 3.0.6) angefertigt.

### 3.4.3 Ingestion von Bäckerhefe durch *Tethya wilhelma*-Knospen

Knospen von *T. wilhelma* wurden in einem Glasschälchen mit in Meerwasser resuspendierten Bäckerhefen (*Saccharomyces cerevisiae*) gefüttert. Nach 2 h und 4 h wurden mehrere Knospen entnommen und für die Rasterelektronenmikroskopie wie unter 3.4.1 beschrieben fixiert. Die fixierten Knospen wurden in Styrolmethacrylat eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden Semi-Dünnschnitte angeschnitten, bis eine Schnittfläche ungefähr im Schwammzentrum erreicht war. Die Proben wurden durch Xylolbehandlung aus dem Styrolmethacrylat herausgelöst (vgl. 3.4.1), für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert und auf die Aufnahme von Hefen untersucht.

## 3.5 Zeitrafferfotografie

Um den Knospungsprozess und Körperkontraktionen von juvenilen und adulten *T. wilhelma*-Exemplaren zu untersuchen, wurden mit einer Nikon Coolpix 990 Digitalkamera in Abständen von 30 s bzw. 3 min Bilder für Zeitreihen aufgenommen. Die Steuerung der Kamera erfolgte über einen PC, mit der Software *DC-Remote Shutter* und *DC-Trigger* (entwickelt von Per Madsen, [www.digital-camera.dk](http://www.digital-camera.dk)). Die Schwämme wurden hierfür entweder direkt im Standard-Kultivierungsaquarium oder in einem speziell für die Zeitrafferaufnahmen angefertigten Miniaquarium mit mattschwarzem Hintergrund platziert. Das Miniaquarium mit einem Volumen von 1,7 l wurde an ein 30 l-Aquarium gekoppelt, in dem die Wassertemperatur permanent geregelt wurde. Für die Zeitrafferaufnahmen wurden die Schwämme auf schwarze, nicht reflektierende Objektträger gesetzt, um einen hohen Kontrast zum Untergrund zu erhalten.

Um Körperkontraktionen von Knospen und die Ausbildung von äußerlich sichtbaren Phänotypen in Experimenten zur Genexpressionskontrolle zu verfolgen, wurde ein spezieller Proben- und Kamerahalter entwickelt, der die Aufnahme von Zeitrafferbildserien im Verlauf der Kultivierung von Schwämmen in Standard 24-well Zellkulturplatten in einem Brutschrank erlaubte (vgl. Abbildung 17C). Die Bilder wurden im Abstand von 1 min mit einer Logitech Portable Webcam C905 aufgenommen, die mit der *Active Web Cam Pro* Software (PY Software) von einem PC aus gesteuert wurde. Die Software erlaubte die simultane Kontrolle mehrerer Kameras, sodass gleichzeitig Zeitreihen von dsRNA-behandelten Knospen und einer Kontrolle möglich waren. Für eine homogene Ausleuchtung der Proben wurden je vier Hochleistungs-LED in den Deckel der 24-well Zellkulturplatten eingebaut.

## 3.6 Molekulargenetische Techniken

### 3.6.1 Expressionsplasmid zur Herstellung von Aktin-dsRNA

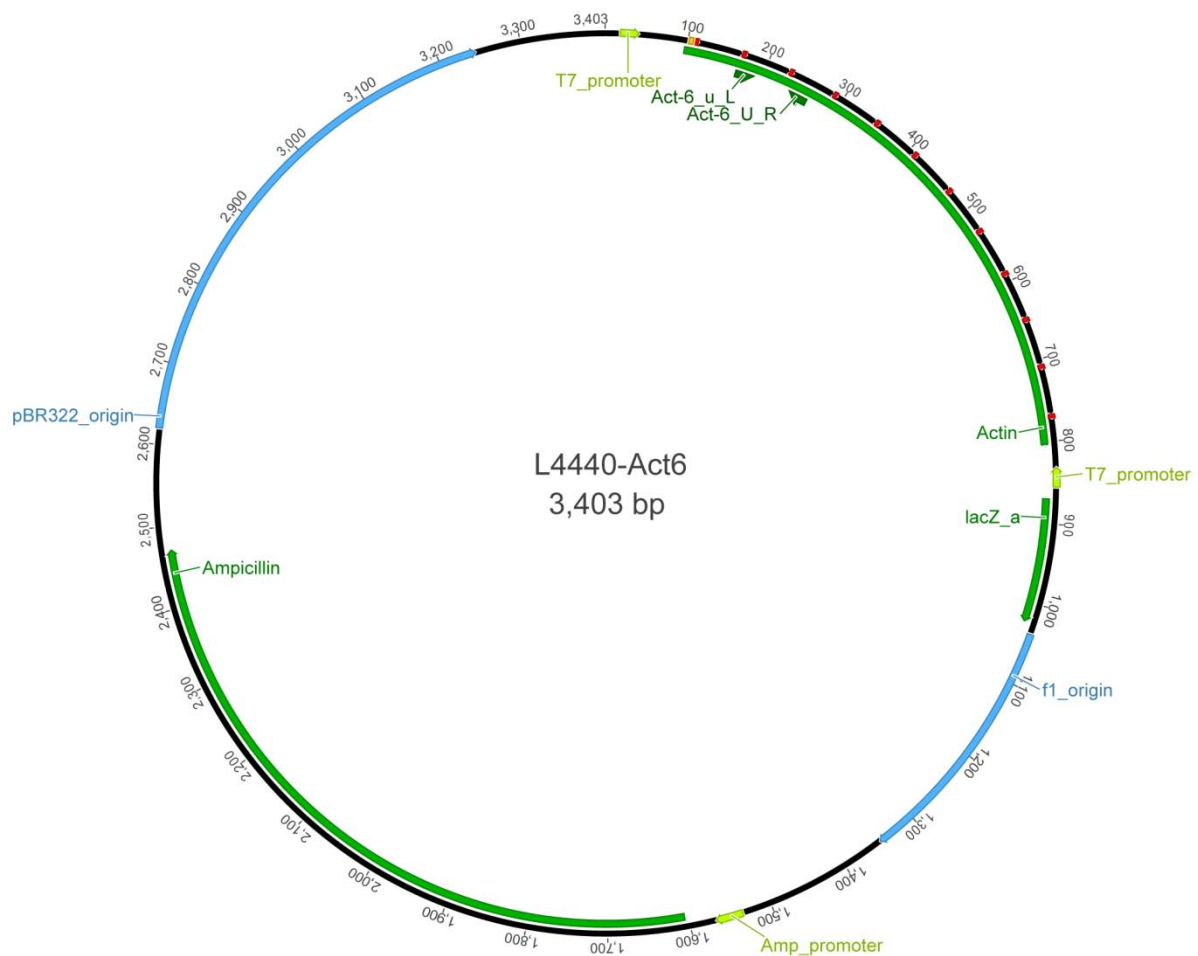
Ein 703 bp langes Fragment des *T. wilhelma* Aktin-Gens (Abbildung 15) aus einer *T. wilhelma*-EST-Datenbank von Dennis Lavrov (Iowa State University, USA) wurde über die *NcoI* und *SaI* Schnittstellen in das L4440 Plasmid (pPD129.36, FireLab Vektor Kit, Addgene Plasmid 1654) eingeführt (Abbildung 16). Der L4440 Expressionsvektor enthält zwei Promotoren der T7-Polymerase, die in entgegengesetzter Orientierung, getrennt durch eine Multiple-Cloning-Site, vorliegen (Timmons & Fire 1998). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmid L4440/Act6 wurde in der Arbeitsgruppe von Lavrov von Karri Haen (Iowa State University, USA) erstellt.

```

1      10      20      30      40      50      60      70
GGAATTGGATATGTTGTGACTCTGAGAGTGTGTGTGTCCTTTCTGAAGACATATCCCCAGCTAGCCAGCTTGAAATC
80     90     100    110    120    130    140    150
CTTCCCCCTTCTTGCTTTTGTCTCAAGAGAAAGAGAAAATCTAGCCAAAATGTGTGACGACGATGTTGCTGCGTTGGTTGT
160    170    180    190    200    210    220    230
AGACAATGGATCTGGTATGTGCAAGGCCGGTTTTGCTGGGGACGATGCCCCACGTGCTGTTCCTTCAATCGTTGGA
240    250    260    270    280    290    300    310
CGCCCCCGTCATCAGGGTGTGATGGTTGGTATGGGACAGAAGGACTCATACGTTGGAGATGAAGCTCAGAGCAAGAGAG
320    330    340    350    360    370    380    390
GTATCCTCACTCTGAAGTACCCCATTTGAACACGGAATGTCACAACTGGGATGATATGGAGAAGATTGGCATCACAC
400    410    420    430    440    450    460    470
CTTCTACAACGAGTTGCGTGTGCCCCTGAAAGAGCATCCAGTTCTGTTGACCGAGGCTCCCCCTCAACCCCAAGGCCAAC
480    490    500    510    520    530    540    550
CGTGAGAAGATGACCCAGATCATGTTGAGACCTTCAACACCCCAAGCAATGTACGTCGCCATCCAGGCCGTCTCTCAC
560    570    580    590    600    610    620    630
TGTACGCTTCTGGACGTACCACTGGTATCGTGTTCGATTCTGGTGATGGTGTCTCTCAGCTGTTCCCATCTACGAGGG
640    650    660    670    680    690    700    703
TTATGCTCTCCCCACGCTATCCTCCGTCTTGACTTGGCCGGACGTGATCTTACCGACTACCTCATGAAGG

```

**Abbildung 15:** 703 bp langes Fragment des *T. wilhelma* Aktin-Gens. Die Sequenz stammt aus einer *T. wilhelma* EST-Datenbank von Dennis Lavrov (Iowa State University, USA).



**Abbildung 16:** Expressionsvektor L4440 mit *T. wilhelma* 703 bp Aktin-Insert. Das Plasmid enthält zwei entgegengesetzt orientierte T7-Promotoren, die für die Expression der Aktin-dsRNA sorgen.

### 3.6.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte durch  $\text{CaCl}_2$  Behandlung (modifiziert nach Dagert & Ehrlich 1979). Zellen einer Glycerinkultur ( $-80^\circ\text{C}$ ) des gewünschten Stammes wurden auf LB-Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Von dieser Platte wurden Zellen entnommen und mittels der Drei-Strich-Methode vereinzelt. Mit einem einzelnen Klon wurde eine Kultur in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 180 UpM inkubiert. 0,5 ml der Übernachtskultur wurden in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB-Medium überführt. Die Kultur wurde für weitere 2-3 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 180 UpM im Schüttler inkubiert bis eine  $\text{OD}_{420} \sim 0,5$  erreicht war. 2 x 20 ml der Kultur wurden in Zentrifugationsgefäße überführt und für mindestens 10 min auf Eis gekühlt bevor sie für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 2200x g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Zellpellet in 5 ml eiskaltem 100 mM  $\text{CaCl}_2$  vorsichtig resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  belassen. Es wurde ein weiteres Mal für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 2200x g zentrifugiert und der Überstand anschließend vollständig abgenommen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 2 ml eiskaltem 50 mM  $\text{CaCl}_2$  + 20 % Glycerin (v/v) resuspendiert und als 200  $\mu\text{l}$  Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  auf Eis belassen und anschließend für die weitere Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.6.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Kalzium-kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach einem auf Inoue (1990) basierenden, modifizierten Protokoll transformiert. Die kompetenten Zellen wurden für 10 min auf Eis aufgetaut, 5 ng Plasmid DNA wurde hinzu pipettiert und vorsichtig gemischt. Zusammen mit der Plasmid DNA wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert bevor sie einem Hitzeschock für 30 s bei  $42^\circ\text{C}$  unterzogen wurden. Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis gekühlt bevor 250  $\mu\text{l}$  LB-Medium oder SOC-Medium zugegeben wurde. Nachdem die Zellen für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert worden waren, wurden 50  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  und der durch Zentrifugation aufkonzentrierte Rest je auf eine LB-Agar-Platte ausplattiert. Der für den eingesetzten *E. coli* Stamm entsprechenden Selektionsmarker war in den jeweiligen LB-Agar-Platten enthalten. Die transformierten Zellen wurden nachfolgend bei  $37^\circ\text{C}$  für rund 16 h inkubiert.

### 3.6.4 Herstellung von Aktin-dsRNA

Das L4440/Act6 Plasmid wurde in Kalzium-kompetente *E. coli* HT115(DE3)-Zellen eingeführt und auf antibiotikahaltigen LB-Agar Platten ausgebracht (Timmons *et al.* 2001). Die LB-Agar-Platten und das 2xYT-Medium enthielten 75 mg/ml Ampicillin und 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Tetracyclin als Selektionsmarker. Für die dsRNA-Fütterungsexperimente wurde eine 10 ml-Kultur in 2xYT-Medium mit einer einzelnen Kolonie von HT115(DE3)/L4440-Act6 inokuliert und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 180 UpM kultiviert. Die Kultur wurde 160x verdünnt und bis zu einer  $\text{OD}_{600} \approx 0,4$  inkubiert. Durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) mit einer Endkonzentration von 0,4 mM wurde die Expression der Aktin-dsRNA induziert. Die Kultur wurde weitere 5 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 180 UpM kultiviert und die Zellen direkt vor der Verfütterung an *T. wilhelma* Knospen mittels Zentrifugation geerntet. Die pelletierten Zellen wurden in steril filtriertem künstliches Meerwasser resuspendiert.

### 3.6.5 Versuchsaufbau für die Genexpressionskontrolle in *T. wilhelma*

#### Versuchsaufbau in Vorversuchen

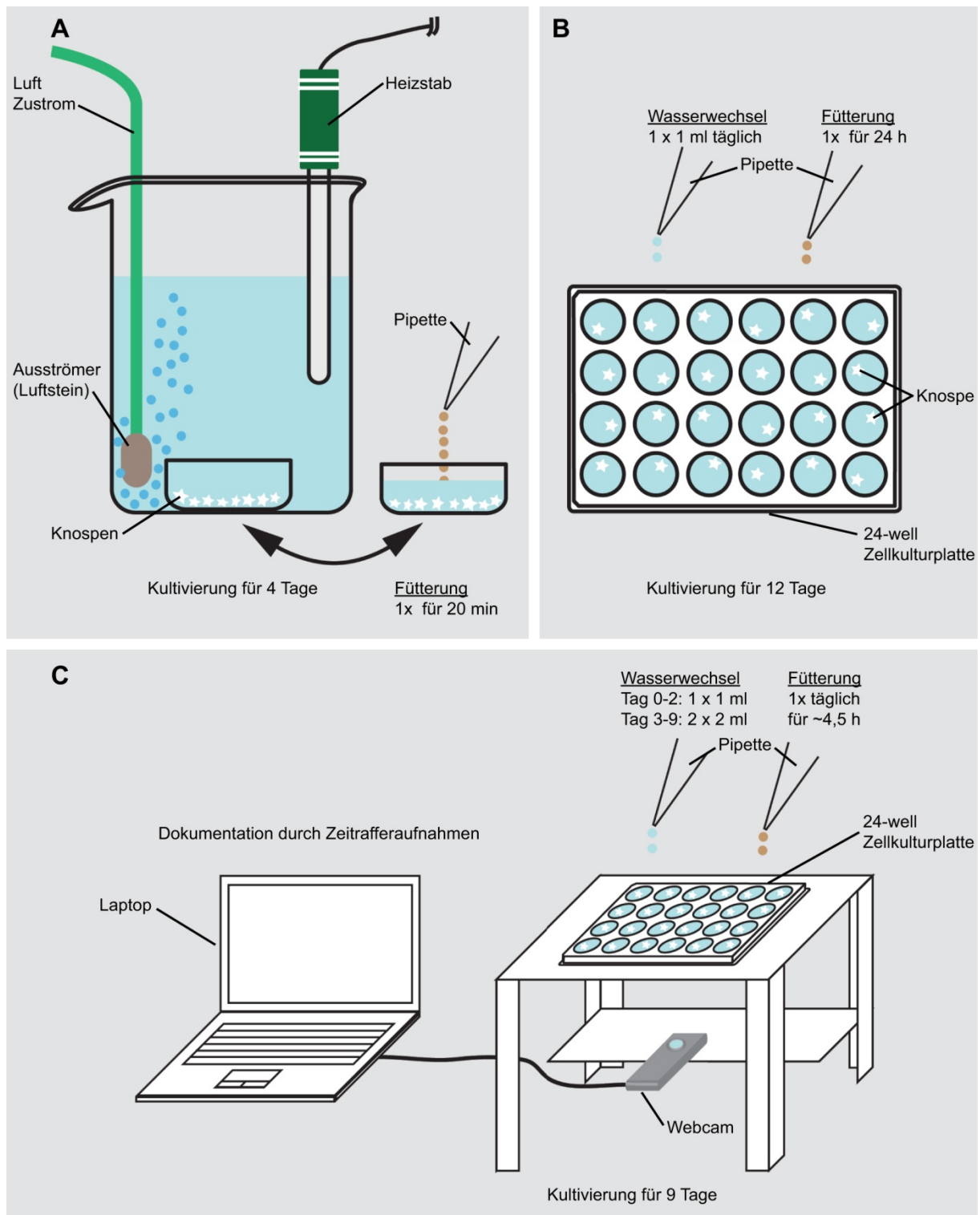
In Vorversuchen kamen zwei unterschiedliche Versuchsaufbauten zum Einsatz (Abbildung 17A-B). In beiden Fällen erfolgte eine Fütterung der Knospen mit dsRNA-exprimierenden Bakterien, die direkt vor der Verfütterung geerntet und in steril filtriertem Meerwasser resuspendiert worden waren.

In ersten Versuchen wurde ein einfacher Versuchsaufbau realisiert, der die Fütterung der Schwämme mit dsRNA-exprimierenden Bakterien in einem separaten Gefäß für 20 min vorsah (Abbildung 17A). Die weitere Kultivierung der Schwämme erfolgte in einem kleinen Aquarium. Als Kontrollgruppe kamen unbehandelte Schwämme zum Einsatz, die direkt vor Beginn des Versuchs fixiert wurden.

Für weitere Versuche wurde das Protokoll auf kleinere Volumina und Standard-Verbrauchsmaterialien aus der Zellkulturtechnik angepasst. Die Kultivierung der Schwämme erfolgte in 24-well Zellkulturplatten, die bei 24 °C in einem Brutschrank inkubiert wurden. Die Knospen wurden in 2 ml künstlichem steril filtriertem Meerwasser einzeln in einer der Vertiefungen gehalten. Die Fütterung mit dsRNA-exprimierenden Bakterien erfolgte über einen Zeitraum von 24 h. Durch mehrfachen Wasserwechsel mit steril filtriertem Meerwasser wurde die Bakterienlösung für die weitere Kultivierung aus dem Well entfernt. Um die Schwämme mit frischem Wasser zu versorgen, erfolgte ein täglicher Wasserwechsel mit sauerstoffgesättigtem steril filtriertem Meerwasser. Als Kontrollgruppe für die relative Quantifizierung dienten direkt vor dem Versuch fixierte unbehandelte Schwämme (Abbildung 17B).

#### Bakterien-exprimierte dsRNA-vermittelte Hemmung der Aktin-Expression

Für die Genexpressionskontrolle in Schwämmen wurde ein nach Timmons (2001) modifiziertes Protokoll eingesetzt. Jungschwämme von *T. wilhelma* wurden in steril filtriertem künstlichem Meerwasser in Standard 24-well Zellkulturplatten bei 24 °C kultiviert. Es erfolgte eine tägliche Fütterung der Knospen durch Inkubation für 4,5 h in einer Bakterienlösung. Hierfür wurden die Bakterien täglich aus einer neuen Kultur geerntet und in steril filtriertem Meerwasser resuspendiert. Für die Experimente zur Manipulation der Aktin-mRNA Level in Knospen kamen *E. coli* HT115(DE3)/L4440-Act6-Zellen, die Aktin-dsRNA exprimieren, zum Einsatz. Als Kontrolle wurden Zellen des selben Stammes, die keine dsRNA produzieren, verfüttert. Auf die Fütterungsphase folgte ein Wasserwechsel, bei dem in den ersten 48 h des Versuchs das halbe Volumen einmal, in der Zeit danach das gesamte Volumen zweimal mit frischem sauerstoffgesättigtem und steril filtriertem künstlichem Meerwasser ausgetauscht wurde. Weitere 5 h später wurden Knospen zur Bestimmung der mRNA-Niveaus entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C für die weitere Bearbeitung gelagert. Über den Zeitraum des Experimentes erfolgte eine Dokumentation durch Zeitrafferfotografie, die die Nachverfolgung einer Ausbildung von äußerlich sichtbaren Phänotypen ermöglicht (vgl. 3.5 Zeitrafferfotografie) (Abbildung 17C).



**Abbildung 17:** Schema unterschiedlicher Aufbauten zu Genexpressionskontrollversuchen mit *T. wilhelma*. (A) Fütterung von *T. wilhelma* Knospen in einem kleinen separaten Schälchen mit dsRNA-exprimierenden Bakterien für 20 min und anschließender Kultivierung bei 24 °C in einem Miniaquarium. (B) Kultivierung von *T. wilhelma* Knospen in einer 24-well Zellkulturplatte bei 24 °C. Die Fütterung mit dsRNA-exprimierenden Bakterien erfolgte für 24 h in der Zellkulturplatte, gefolgt von einem Wasserwechsel zur Entfernung der im Wasser verbliebenen Bakterien. Im weiteren Verlauf der Kultivierung erfolgte ein täglicher Wasserwechsel mit frischem vorgewärmten und sauerstoffgesättigtem Meerwasser. (C) Kultivierung von *T. wilhelma* Knospen in einer 24-well Zellkulturplatte bei 24 °C. Die tägliche Fütterung mit dsRNA-exprimierenden Bakterien erfolgte für 4,5 h in der Zellkulturplatte gefolgt von einem Wasserwechsel mit frischem vorgewärmten und sauerstoffgesättigtem Meerwasser zur Entfernung der im Wasser verbliebenen Bakterien. Parallel erfolgte eine Dokumentation der Kontraktionsfähigkeit der Knospen anhand von Zeitrafferaufnahmen.

### 3.6.6 RNA-Extraktion

Für RNA-Arbeiten verwendete Plastikgeräte (Reaktionsgefäße, Spitzen, Homogenisator, wurden entweder aus frisch geöffneten RNase-freien Originalpackungen entnommen oder vor der Verwendung für 3 h mit 3 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Wasser behandelt und anschließend mit RNase-freiem Wasser gespült. Wenn möglich wurden RNase-freie Chemikalien eingesetzt.

Um die mRNA-Niveaus zu quantifizieren wurde die RNA einzelner Knospen (Knospenmasse < 3 mg) unter Verwendung des *NucleoSpin RNA XS*-Kit (Macherey-Nagel) extrahiert. Abgesehen vom Aufschluss der Proben wurde die Extraktion nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Knospen wurden hierzu mit einer Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl RA1-Lysepuffer und 2 µl TCEP überführt und mit einem kleinen manuellen Homogenisator (Eppi-Pistille, schuett biotec.de) mechanisch aufgeschlossen. Nach Zugabe von 5 µl Träger-RNA wurde das Lysat über Filtersäulchen von großen Zellfragmenten und Skelettelementen gereinigt (Zentrifugation bei 11.000x g für 30 s). Die Bedingungen für die Bindung der RNA an eine Silica-Membran der Isolationssäulchen wurde mit 200 µl 70 % Ethanol eingestellt und die Proben für 30 s bei 11.000x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 100 µl MDB-Puffer wurden die Proben zweimal für 30 s bei 11.000x g zentrifugiert, um die Silica-Membran zu trocknen. Für einen DNA-Verdau wurden 25 µl rDNase auf die Silica-Membran pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend in drei Schritten mit RA2-Puffer (100 µl, 400 µl, 200 µl) gewaschen, wobei nach dem ersten Schritt für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach den ersten beiden Waschschritten wurde jeweils für 30 s und im dritten Waschschriff für 2 min bei 11.000x g zentrifugiert. Die RNA wurde in zwei Schritten mit 10 µl H<sub>2</sub>O in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde nach dem ersten Zentrifugationsschritt das gesamte Eluat (10 µl) erneut auf die Silica-Membran der Isolationssäule geladen und erneut zentrifugiert (30 s bei 11.000x g). Die Ausbeute betrug zwischen 0,26 µg/ml und 0,64 µg/ml.

### 3.6.7 cDNA-Synthese

Die cDNA Synthese wurde unter Verwendung des *First Strand cDNA Synthesis*-Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktionsgemische setzten sich wie folgt zusammen:

RNA	2,5 µl
oligo(dt) <sub>18</sub> -Primer	1 µl
Reaktionspuffer (5x)	4 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
Ribolock (RNase Inhibitor)	1 µl
M-MuIV-Reverse Transkriptase	2 µl
H <sub>2</sub> O	<u>7,5 µl</u>
	20 µl

Die Synthese erfolgte bei 37 °C (1 h) und wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 5 min abgestoppt.



### 3.6.8 Sequenzierung

Durch PCR amplifizierte Fragmente des Aktin-, TALDO und RPS-Gens wurden für die eindeutige Identifizierung durch die Firma Agowa (Berlin) sequenziert. Die PCR-Fragmente wurden hierfür in einen pGEM-T Vektor (Promega) kloniert und in chemisch kompetente JM109 *E. coli* Zellen transformiert. Für die Klonierung wurden die PCR-Fragmente 1:1000 (v/v) verdünnt und in einem Mastermix bestehend aus Ligations-Puffer, T4 DNA Ligase und pGEM-T Vektor entsprechenden den Herstellervorschriften für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation der JM109 *E. coli* Zellen mit dem pGEM-T Vektor erfolgte wie unter 3.6.3 beschrieben. Von einzelnen Klonen wurden 10 ml LB-Flüssigkulturen angefertigt, die bei 37 °C und 180 UpM über Nacht kultiviert wurden. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 11.000x g für 2 min geerntet. Es erfolgte eine Plasmidextraktion mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab) entsprechend den Vorschriften des Herstellers. Das Bakterienzellpellet wurde hierfür in 250 µl Lyse-Puffer resuspendiert und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 350 µl Neutralisations-Puffer zugegeben und 10 min bei 10.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf DNA-Isolations-Säulchen transferiert und für 1 min bei 10.000x g zentrifugiert. Es erfolgten drei Waschschrte mit PW-Plasmid-Puffer (1x) und DNA-Wasch-Puffer (2x). Auf jeden der Waschschrte folgte eine Zentrifugation bei 10.000x g für 1 min. Vor der Elution mit zweimal 25 µl Wasser durch zentrifugieren bei 5.000x g für 1 min, wurde die Silica-Membran der DNA-Isolations-Säulchen mittels Zentrifugation für 1 min bei 5.000x g getrocknet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde für die Sequenzierung mit Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt.

### 3.6.9 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Real-Time-PCR erfolgte in einem *SmartCycler*-System (Cepheid, Vertrieb in Deutschland durch PeqLab) und wurde mit der *SmartCycler* Software ausgewertet. Für die Real-Time-PCR kamen folgende Primer zum Einsatz: Ein 92 bp Fragment des *T. wilhelma*-Aktin-Gens wurde mit Act-6\_U\_L (5'- GCTTGAAATCCTTCCCCTTC-3') und Act-6\_U\_R (5'- TCTACAACCAACGCAGCAAC-3') amplifiziert und ein 61 bp großes Fragment des S5-verwandten-Clusters (RPS5) der 40S ribosomalen Untereinheit als interne Referenz für die relative Quantifizierung der Aktin mRNA-Niveaus wurde mit TW12B02-RPS5-L (5'- ACTCCACTCGTATCGGTCGT-3') und TW12B02-RPS5-R (5'- AGAGGGGACACATCAACA GC-3') amplifiziert. Die eingesetzte cDNA wurde nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt (94 °C für 180 s) in 45 Zyklen (94 °C für 30 s, 60 °C für 30 s, 72 °C für 45 s) amplifiziert. Die Konzentration der PCR-Produkte wurde anhand der Fluoreszenzintensität von SYBR-Green I am Ende jedes Zyklus verfolgt. Die Reaktionsmedien wurden als Mastermix für die technischen Replikate angesetzt und anschließend auf die einzelnen Reaktionsgefäße aliquotiert. Damit wurden gleichbleibende Reaktionsbedingungen sichergestellt. Der Mastermix bestand aus PeqLab *KAPA SYBR Fast qPCR Mastermix*, Primern, H<sub>2</sub>O und cDNA. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

cDNA (500 ng)		x µl
Primer 1 (50 pmol/µl)		0,5 µl
Primer 2 (50 pmol/µl)		0,5 µl
PeqLab Mastermix		10 µl
H <sub>2</sub> O	ad	25 µl

Die relative Quantifizierung der mRNA-Niveaus erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001). Die Veränderung der Threshold-Cycle-Number ( $\Delta Ct$ ) wurde durch die Subtraktion des  $\Delta Ct_{RPS5}$ -Wert vom  $\Delta Ct_{Aktin}$ -Wert auf das RPS5-Referenzgen normalisiert. Der Einfluss der RNAi-Behandlung wurde als  $\Delta\Delta Ct$  durch die Subtraktion von  $\Delta Ct_{Kontrolle}$  von  $\Delta Ct_{Behandelt}$  berechnet. Das Vielfache der Veränderung wurde durch die Berechnung von  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  bestimmt. Die Veränderungen der Aktin-mRNA-Niveaus wurden als Vielfaches der Aktin-mRNA-Niveaus einer dsRNA-behandelten Knospe bezogen auf die Aktin-mRNA-Niveaus einer unbehandelten Knospe (Kontrolle) dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Knospenentwicklung in *Tethya wilhelma*

#### 4.1.1 Entwicklungsdauer des Knospungsprozesses

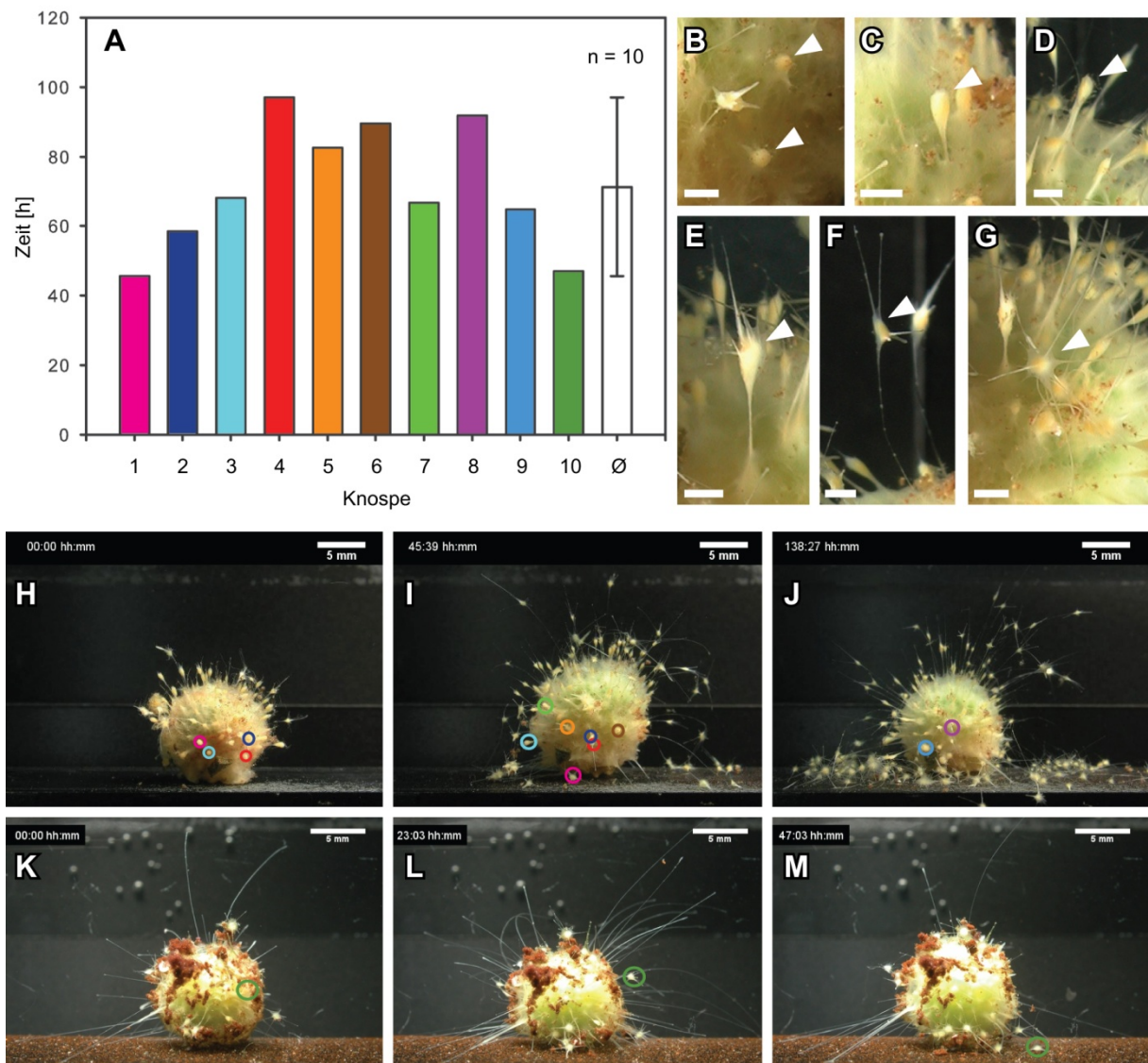
Um die Entwicklungsdauer des Knospungsprozesses in *T. wilhelma* zu bestimmen, wurden Zeitrafferaufnahmen von adulten knospenden Individuen angefertigt (Anhang 1, Film 1-2). Die Zeitrafferaufnahmen ermöglichten die Verfolgung einzelner Knospen in den Bildserien zur Bestimmung der Entwicklungsdauer (Abbildung 18H-M). Hierfür wurde die Entwicklung von Knospen vom Zeitpunkt der Ablösung vom Mutterschwamm bis zu den frühesten, äußerlich erkennbaren Stadien zurückverfolgt. Im Durchschnitt nahm die Entwicklung der Knospen rund 71 h in Anspruch (Abbildung 18A). Die beobachteten Entwicklungszeiträume lagen in einem Bereich zwischen 46 h und 97 h.

Neben der Bestimmung des Entwicklungszeitraums ermöglichten die Zeitrafferaufnahmen des Knospungsprozesses eine generelle makroskopische Betrachtung der Knospenbildung in *T. wilhelma*. Knospen werden zunächst im Cortex direkt unter der Oberfläche als dichtere Bereiche, in denen sich Zellen sammeln, sichtbar (Abbildung 18B). Dieses Stadium kann bis zu 48 h in Anspruch nehmen, bevor die Knospen als birnenförmige Verdickung an der Spitze eines kurzen Stiels, der sie von der Schwammoberfläche abhebt, deutlich sichtbar werden (Abbildung 18C). Im weiteren Verlauf wird die Knospe zunächst durch Verlängerung des Stiels weiter von der Schwammoberfläche emporgehoben, bevor äußerlich in der Knospe neu angelegte Megasklerenbündel sichtbar werden, welche von der Orientierung des den Stiel bildenden Megasklerenbündels abweichen. Insgesamt erscheinen die Knospen in diesem Stadium meist stark abgeflacht (Abbildung 18E).

Die Form der Knospen verändert sich in der weiteren Entwicklung hin zu einer abgeflachten Kugel. Eine beginnende Differenzierung von Cortex- und Choanodermbereichen zeichnet sich ab und wird durch die Ausbildung eines fast transparenten Bereiches, der den dicht gepackten und gelblich erscheinenden Choanodermbereich umgibt, erkennbar. Weiterhin besitzen die Knospen in diesem Stadium eine größere Zahl von Megasklerenbündeln und teilweise schon deutlich ausgeprägte Körperausläufer (Abbildung 18F). Die Ausbildung dieses Stadiums kann bis zu 80 h in Anspruch nehmen.

Knospen, die kurz vor der Ablösung stehen, weisen in der Regel einen fast kugelförmigen Körper auf, in dessen Zentrum deutlich ein dichterer Bereich, der dem Choanosom zuzuordnen ist, zu erkennen ist. Dieser Bereich wird von einer beinahe transparenten Region umschlossen, die zum Cortex gehört (Abbildung 18G). Im Vergleich zum vorhergehenden Stadium zeigen die Knospen eine wiederum erhöhte Anzahl von Megasklerenbündeln, die radiär in alle Raumrichtungen orientiert sind und besitzen lange Körperausläufer, deren Länge das bis zu Zwanzigfache der Knospendurchmesser erreichen kann. Zum Teil stellen die Knospen mit diesen bereits Kontakt zum Substrat her und heften sich an selbigem fest.

Die Knospen lösen sich vom Mutterschwamm, indem der Stiel, der die Knospe mit dem Mutterschwamm verbindet, bricht. Bereits kurz nach der Ablösung zeigen die meisten der Knospen mehr oder weniger ausgeprägte Körperkontraktionen (vgl. Abschnitt 4.1.5).



**Abbildung 18:** (A) Individuelle und durchschnittliche Entwicklungsdauer von *T. wilhelma*-Knospen (1-10) bestimmt anhand von Zeitrafferaufnahmen. Die untersuchten Knospen sind in H-M den Balken entsprechend farblich gekennzeichnet. (B-G) Details von unterschiedlichen Knospen-Entwicklungsstadien (Maßstab in B-G 1 mm). Zu Beginn der Knospenentwicklung zeigt sich eine Anhäufung von Zellen im Cortex (B), aus der sich im weiteren Verlauf eine birnenförmige, gestielte Knospe entwickelt (C). Der Stiel, an dessen Spitze sich die Knospe befindet, wird im weiteren Verlauf der Entwicklung länger (D) und es werden weitere Megasklerenbündel in der Knospe sichtbar (E). Spätere Stadien zeigen abgeflachten Kugel (F). Kurz vor der Ablösung besitzen die Knospen annähernd einen kugelförmigen Körper, deutlich erkennbar getrennte Choanosom- und Cortexbereiche und lange Körperausläufer (D). Das Choanosom wird in diesem Stadium als dichter, gelblich erscheinender Bereich im Schwammzentrum sichtbar, wohingegen der Cortexbereich halb transparent erscheint. (H-J) Bildserie aus einer Zeitrafferaufnahme für die Analyse der Entwicklungsdauer von Knospen. Bemerkenswert ist die große Anzahl an Knospen, die sich über einen Zeitraum von rund 138 h entwickelt hat (J). Die gesamte Bildsequenz ist als Film 1 in Anhang 1 auf CD hinterlegt. (K-M) Bildserie einer Zeitrafferaufnahme, die die Entwicklung einer Knospe (grüner Kreis) im Verlauf von 47 h dokumentiert. Die gesamte Bildsequenz ist als Film 2 in Anhang 1 auf CD hinterlegt.

#### 4.1.2 Auflösung und Interpretation von SR- $\mu$ CT Datensätzen

Die Rekonstruktion der SR- $\mu$ CT Aufnahmen von 10 vollständigen Knospen von *T. wilhelma* ergab hoch aufgelöste 3D-Bilddatensätze, bei denen morphologische Strukturen von kompletten Individuen bis auf Gewebsebene hinab sichtbar sind (Tabelle 1). Die Bildstapel mit einer Voxelgröße von  $1,4 \cdot 1,4 \cdot 1,4 \mu\text{m}^3$  bzw.  $1,5 \cdot 1,5 \cdot 1,5 \mu\text{m}^3$  entsprechen einer gemessenen Auflösung von  $3,9 \mu\text{m}$  bzw.  $3,0 \mu\text{m}$ . Morphologische Details wie Choanozytenkammern konnten ebenso wie die Skleren des hoch absorbierenden Silikatskelettes identifiziert werden (Abbildung 19A). Die sich entwickelnden Choanosom- und Cortex-Strukturen sind eindeutig unterscheidbar anhand ihrer unterschiedlichen Zelldichte. Die morphologische Interpretation der mikrotomografischen Bilder wurde anhand von rasterelektronenmikroskopischen und DIC-mikroskopischen Aufnahmen überprüft (Abbildung 19B). Die Auflösung der licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist höher als die der Röntgen-Mikrotomografie, doch nur die letztere Methode liefert die benötigten 3D-Datensätze. Diese ermöglichen nicht nur eine Visualisierung, sondern auch die Möglichkeit zu volumetrischen Analysen, die die benötigten hochwertigen quantitativen Informationen liefern.

#### 4.1.3 Grundsätzliche Ergebnisse der qualitativen und quantitativen SR- $\mu$ CT Bildanalyse von Knospen

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Datenanalyse der SR- $\mu$ CT Datensätze anhand eines ausgewählten Datensatzes ausführlich erläutert werden. Da die am weitesten entwickelten Knospen ein typisches Muster der anatomischen Strukturen zeigen, wurde Datensatz J (Tabelle 1) als Beispiel ausgewählt.

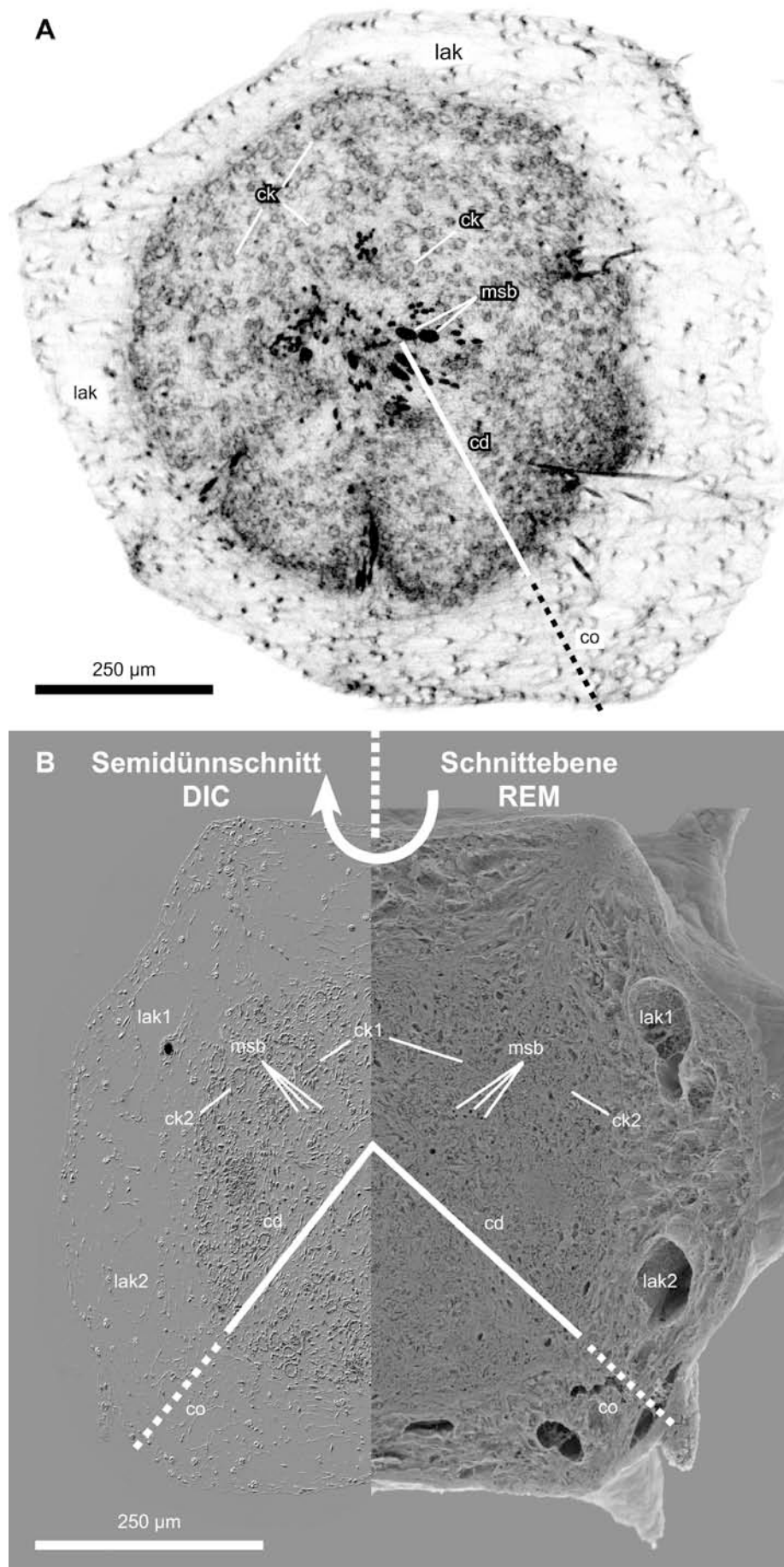
In den Bilddatensätzen können anhand unterschiedlicher Röntgenstrahlungsabsorptionseigenschaften das Mineralskelett, Wasserleitungssystemelemente und Gewebeanteile unterschieden werden (Abbildung 20). Alle anatomischen Merkmale des Schwammes sind in Schaubildern der Volumenanalyse eindeutig identifizierbar und zeigen in den späten Knospen eine annähernd symmetrische Anordnung der Anteile des Wasserleitungssystems, des Gewebes und der Skelettelemente entlang der drei Hauptachsen des Volumendatensatzes: x-Achse (=zy-Schnitt Bildstapel), y-Achse (=zx-Schnitt Bildstapel), z-Achse (=xy-Schnitt Bildstapel) (Abbildung 20B). Der Durchmesser des untersuchten Individuums betrug ca.  $1000 \mu\text{m}$ . Die Koordinatenachsen sind relativ zum Schwammmittelpunkt dargestellt und reichen daher von  $-500 \mu\text{m}$  bis  $+500 \mu\text{m}$ .

In xy-Schnitten reicht der Anteil der Skelettelemente von 33 % bis 0,5 %, der des Wasserleitungssystems von 73 % bis 13 % und der des Gewebes von 69 % bis 22 %. Die Variation dieser Anteile ist nicht zufällig, sondern spiegelt die morphologische Anordnung wieder, wie anhand der Beispielschnitte ersichtlich wird (Abbildung 20C-N): Das zentrale Choanosom erstreckt sich von  $-199 \mu\text{m}$  bis  $236 \mu\text{m}$  mit annähernd gleichen Anteilen von Gewebe und Wasserleitungssystem. Im gesamten Schwamm, mit Ausnahme der Ausläufer,

Nächste Seite ►►►

---

**Abbildung 19:** Morphologie einer abgelösten *T. wilhelma* Knospe (Stadium 4). Vergleich zwischen (A) einem virtuellen Schnitt eines SR- $\mu$ CT Datensatzes (Farben invertiert) und (B) einer kombinierten „rasterelektronenmikroskopischen-Histologie“-Aufnahme bestehend aus einem Semidünnschnitt, aufgenommen mit DIC-Mikroskopie und einem rasterelektronenmikroskopischen Bild der korrespondierenden Schnittflächen nach dem Schneiden. Abkürzungen: ck – Choanozytenkammer, cd – Choanoderm, co – Cortex, lak – Lakune, msb – Megasklerenbündel (verändert nach Hammel *et al.* 2009).



**Abbildung 19:** Legende siehe vorhergehende Seite.

liegt der Anteil der Skelettelemente bei rund 1 %. Der Cortextbereich findet sich in den Regionen zwischen -388  $\mu\text{m}$  bis -200  $\mu\text{m}$  und 236  $\mu\text{m}$  bis 469  $\mu\text{m}$  und wird von den großen Lakunen des Wasserleitungssystems dominiert. Daher erreicht das Wasserleitungssystem hier mit bis zu 63 % bzw. 73 % einen hohen Anteil. Korrespondierend hierzu hat das Schwammgewebe entsprechend nur einen Anteil von 30 % bzw. 21 %. Körperausläufer des Schwammes finden sich in der grafischen Darstellung der Ergebnisse entsprechend an den Randbereichen des Diagramms an die Cortextbereiche anschließend.

Sie sind charakterisiert durch eine Reduktion des Anteils des Wasserleitungssystems und eine deutliche Zunahme des Anteils der Skelettelemente. Da die dünnen filamentösen Körperausläufer größtenteils aus Megasklerenbündeln umgeben von einer dünnen Gewebsschicht bestehen, steigen die relativen Werte der Skelettelemente im Vergleich zum Schwammzentrum signifikant an. Diese Bereiche steuern aufgrund ihres geringen Anteils am untersuchten Gesamtvolumen nur einen sehr kleinen Beitrag zum Gesamtergebnis bei. In der gewählten Darstellung treten sie in den Randbereichen des Schaubildes sehr prominent in Erscheinung, da sie hier von keinen weiteren Teilen des Schwammkörpers überlagert werden und somit alleinig zum untersuchten Volumen in diesem Bereich beitragen.

Das gleiche Verteilungsmuster wie für die xy-Schnitte ergibt sich ebenfalls entlang der beiden weiteren Hauptachsen des Volumendatensatzes (zy-Schnitte und zx-Schnitte). In den zy-Schnitten sind sowohl der Cortex (hoher Anteil des Wasserleitungssystems) als auch das Choanoderm (hoher Gewebeanteil) wieder eindeutig zu identifizieren. Der Cortex erstreckt sich von -535  $\mu\text{m}$  bis -285  $\mu\text{m}$  und von 160  $\mu\text{m}$  bis 506  $\mu\text{m}$ . Er umschließt das im Zentrum befindliche Choanoderm (-284  $\mu\text{m}$  bis 159  $\mu\text{m}$ ). Der Anstieg des Anteils des Skeletts von 1 % auf 3 % bei ungefähr -80  $\mu\text{m}$  stellt das Zentrum der Megasklerenbündel dar. Im zx-Bildstapel befindet sich das Zentrum der Sklerenbündel bei rund -7  $\mu\text{m}$ , ebenfalls erkennbar am Anstieg des Skelettanteils von 1 % auf 3 %. Für den Cortex und das Choanoderm ergibt sich ein vergleichbares Bild wie in den zwei zuvor betrachteten Richtungen des Datensatzes.

Durch Mittelung der gemessenen Anteile entlang der drei Hauptachsen (xyz-Mittelwert, Abbildung 20B unten) wurde ein charakteristisches Verteilungsmuster gewonnen. Die erhaltenen Diagramme für alle drei Messungen sind auffällig symmetrisch bezogen auf das Zentrum, und die Standardabweichung ist relativ gering. Das Choanoderm erstreckt sich  $\pm 200 \mu\text{m}$  vom Zentrum. Es schließt sich der Cortex mit einer Ausdehnung bis zu  $\pm 480 \mu\text{m}$  an. Dies ist typisch für einen kugelförmigen, annähernd punktsymmetrischen

Nächste Seite ►►►

**Abbildung 20:** Detaillierte Visualisierung und Analyse der Morphologie einer Stadium 4-Knospe von *T. wilhelma* (Datensatz J, Tabelle 1) auf der Grundlage von SR- $\mu\text{CT}$  Röntgenabsorption und volumetrischen Messungen. (A) Stereopaar-Rendering mit segmentierten morphologischen Strukturen: Schwammgewebe (gelb) unterteilt in Cortex (co) und Choanoderm (cd) mit entwickelten Choanozytenkammern (ck), Exopinacoderm (exp), Skelett (rot) und Wasserleitungssystem (blau) mit Lakunen (lak). (B) Entsprechende Ergebnisse der volumetrischen Messungen. Anteile [%] von Schwammgewebe, Skelettelementen und Wasserleitungssystem, die auf 1,4  $\mu\text{m}$  Schnitten bestimmt wurden. Das anteilige Volumen ist entlang aller drei Raumrichtungen (x-, y- und z-Achse) sowie als xyz-Mittelwert mit Standardabweichung im Verhältnis zum Schwammzentrum ( $x,y,z = 0,0,0 \mu\text{m}$ ) dargestellt. Die Pfeile und Kleinbuchstaben verweisen auf die Schnitte (C-N). Die Hauptstrukturen des Schwammkörpers und die Körperausläufer (aus) sind mit unterschiedlichen Grauwerten unterlegt. (C-N) Beispiele von 1,4  $\mu\text{m}$  Schnitten in originalen Grauwerten (linke Spalte) und mit, auf der Röntgenabsorption basierenden Segmentierung, eingefärbten morphologischen Strukturen (rechte Spalte). Für jede Raumrichtung sind zwei Schnitte dargestellt: xy-Schnittebene (C, D, I & J), zx-Schnittebene (E, F, K & L), zy-Schnittebene (G, H, M & N). Die Kleinbuchstaben und Linien in den Grauwertschnittbildern verweisen auf die entsprechende Position der orthogonalen Schnittebenen, die als Beispiel in C-N gezeigt werden (aus Hammel *et al.* 2009).



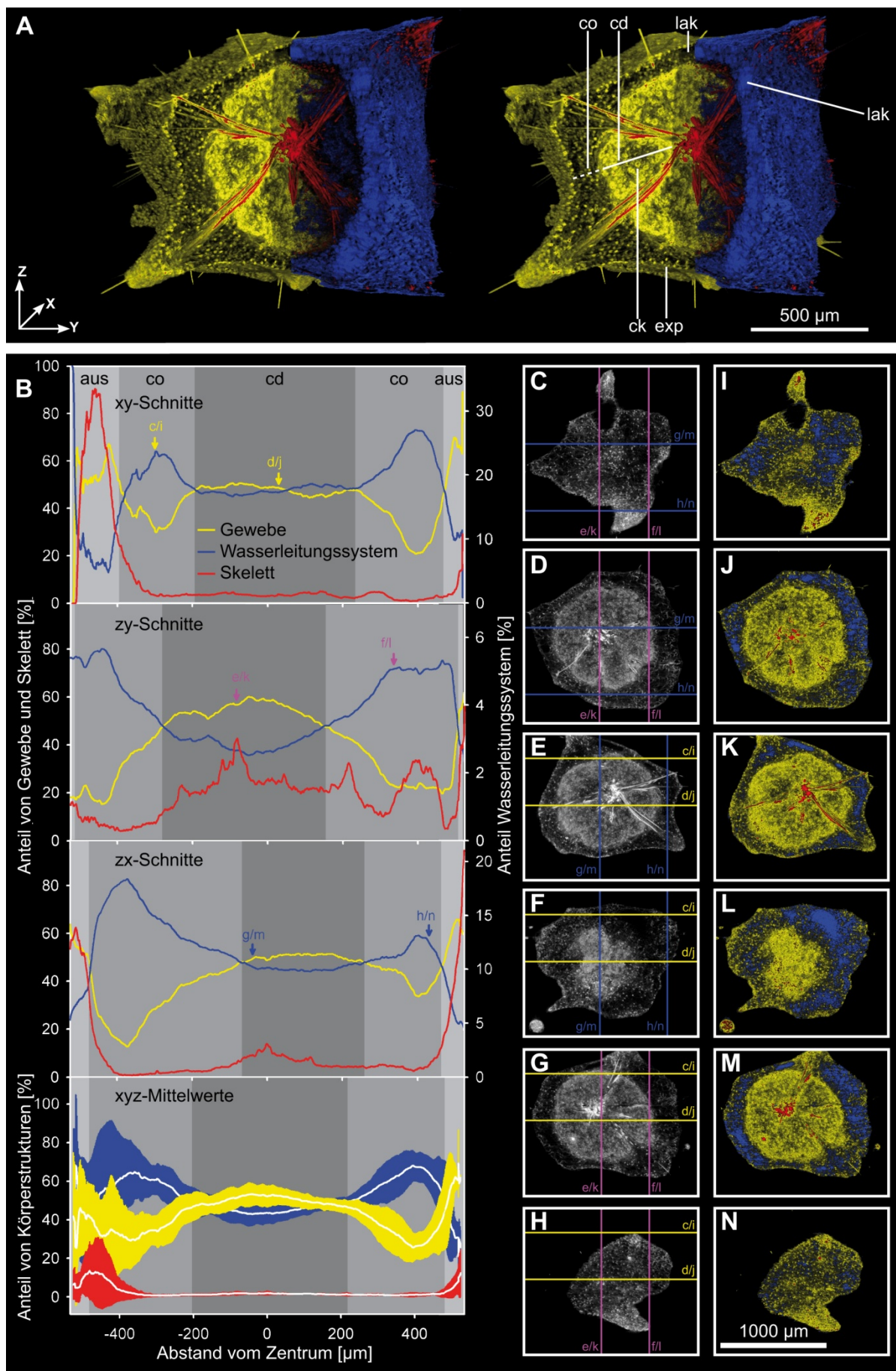


Abbildung 20: Legende siehe vorhergehende Seite.



Schwammkörper, der mit dem Körperbau eines adulten Individuums von *T. wilhelma* vergleichbar ist. Nur in den Randbereichen, die die Körperausläufer repräsentieren, ist die Variabilität der Anteile der gemessenen Strukturen höher, wodurch sich die Standardabweichung erhöht.

#### 4.1.4 Merkmale unterschiedlicher Knospenstadien von *Tethya wilhelma*

Die dreidimensionale virtuelle Rekonstruktion und volumetrische Analyse von 10 SR- $\mu$ CT Datensätzen von *T. wilhelma* Knospen offenbarte eine räumlich-zeitliche Serie für alle drei funktionellen morphologischen Schwammkompartimente, wie oben beispielhaft beschrieben. Ihre Veränderungen im zeitlichen Kontext belegen die Entwicklung des Schwammcortex und des Choanosoms vom ersten erkennbaren Ansatz in funktionelle morphologische Einheiten. Abhängig von der Entwicklungsstufe der Knospen sind Choanozytenkammern und ein Netzwerk aus feinen Kanälen im Choanosom nachweisbar. Viele dieser Kanäle weisen Durchmesser nahe der Auflösungsgrenze auf. Die feinsten Kanäle, die das einführende System mit den Choanozytenkammern verbinden, können daher in keiner der Entwicklungsstufen aufgelöst werden.

Die Diagramme der einzelnen Knospen ergaben charakteristische räumlich-zeitliche Veränderungen der anteiligen Volumina und der quantitativen Verteilung des Gewebes, des Wasserleitungssystems und des Skeletts innerhalb der Knospen (Abbildung 21). Die gesamte Kurvenform der einzelnen Strukturen verändert sich spezifisch während der Knospenbildung und -reifung. Sie zeigt charakteristische Merkmale der einzelnen Stadien. Neu entstehende Knospen zeigen eine Dominanz des Gewebes in den frühesten Stadien (Abbildung 21A-B) bzw. maximal eine gleichmäßige Verteilung von Gewebe und Wasserleitungssystemelementen (Abbildung 21C). In den weiteren Entwicklungsstadien ändert sich die Verteilung: Elemente des Wasserleitungssystems überwiegen im sich entwickelnden Cortex (Abbildung 21J). In den juvenilen Schwämmen sind alle anatomischen Strukturen durch eindeutige Maxima oder Plateaus vertreten. Der Cortex und das Choanosom sind jedoch auch schon in frühen Stadien in den Kurven zu erkennen (Abbildung 21D-H).

Die Knospen können anhand einer Kombination von volumetrischen Daten, Kurvencharakteristika und qualitativen Merkmalen (z. B. Gesamtform der Knospe, Organisation des Skeletts, Differenzierung des Cortex und des Choanosoms, Anwesenheit und Organisation von Kanälen) in vier Kategorien eingeteilt werden. Die sich daraus ergebende Reihe von räumlich-zeitlichen Mustern ist charakteristisch für die Knospenentwicklung und -reifung.

Nächste Seite ►►►

---

**Abbildung 21:** Volumenanalyse von Körperstrukturen in *T. wilhelma*-Knospen anhand von SR- $\mu$ CT-Bilddatensätzen. (A-C) Stadium 1-Knospen ohne Differenzierung von Cortex und Choanosom; (D-F) Stadium 2-Knospen ohne distinktes Choanoderm, jedoch mit beginnender Differenzierung von Kanälen des Wasserleitungssystems; (G-H) Stadium 3-Knospen mit früh entwickeltem Choanoderm (ecd) und sich entwickelndem Cortex (eco); (I-J) Stadium 4-Knospen mit entwickelten Choanoderm- (cd) und Cortex- (co) Bereichen. Die Kurven zeigen relative volumetrische Anteile der wichtigsten morphologischen Strukturen des Schwamms: Gewebe (gelb), Wasserleitungssystem (blau) und Skelett (rot). Charakteristische Kurvenmuster für bestimmte Regionen in Entwicklungsstadien der Knospen sind in der schematischen Darstellung der Kurvenverläufe wie folgt markiert: (sz – Skelettzentrum, aus – Körperausläufer (Filamente), st – Stiel). Die Ergebnisse der volumetrischen Analyse sind jeweils für die drei Hauptachsen des 3D-Datensatzes gezeigt: z-Achse (2. Spalte), y-Achse (3. Spalte) und x-Achse (4. Spalte) (basierend auf Hammel *et al.* 2009).

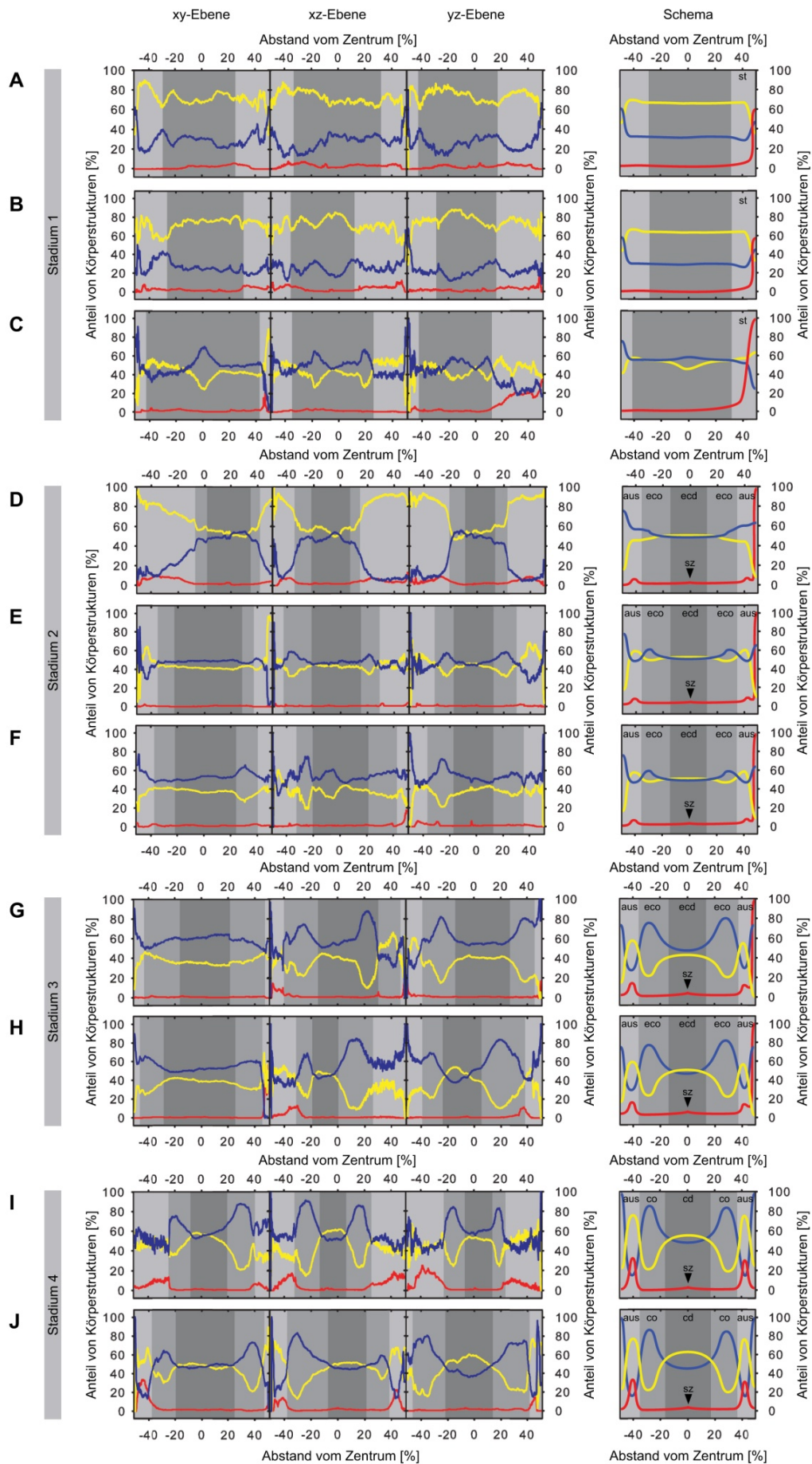
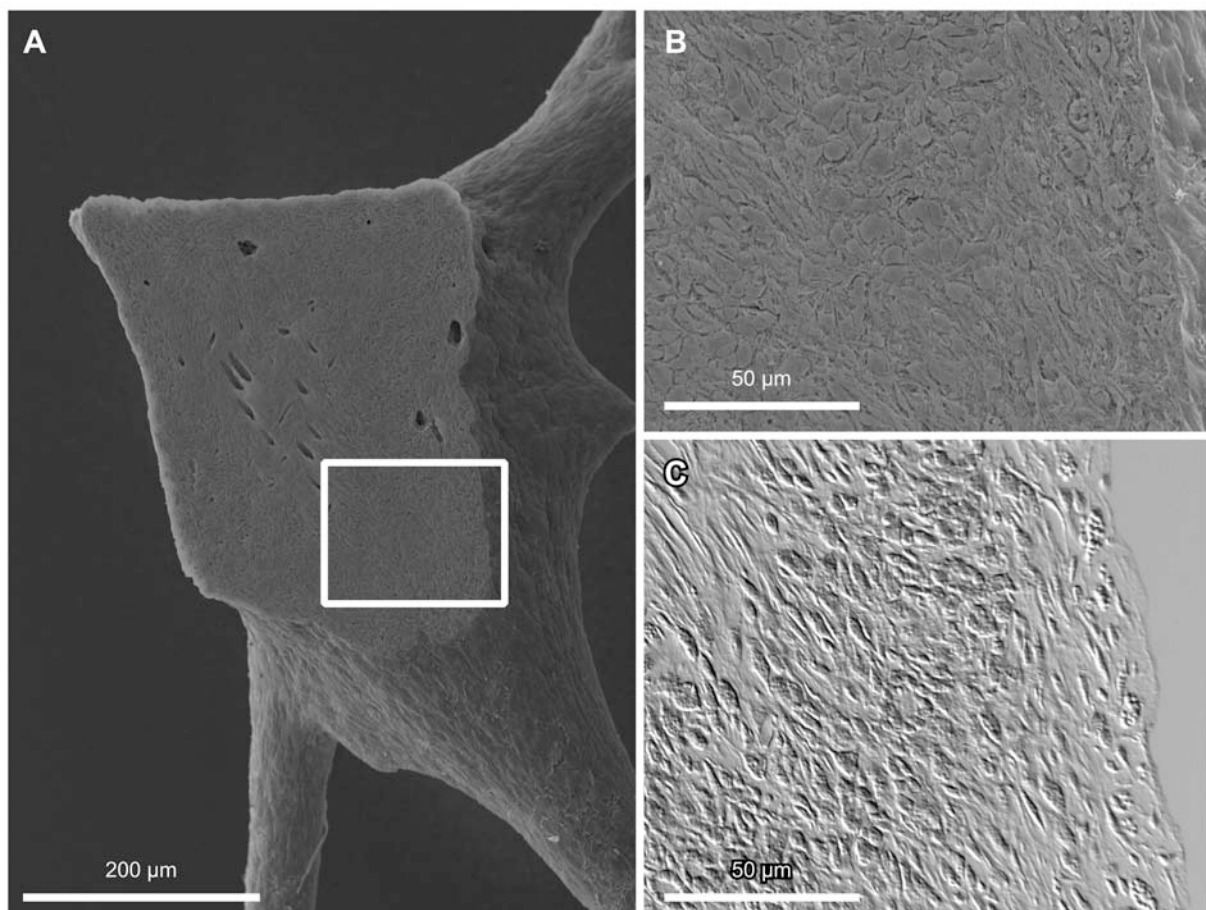


Abbildung 21: Legende siehe vorhergehende Seite.

## Stadium 1-Knospen

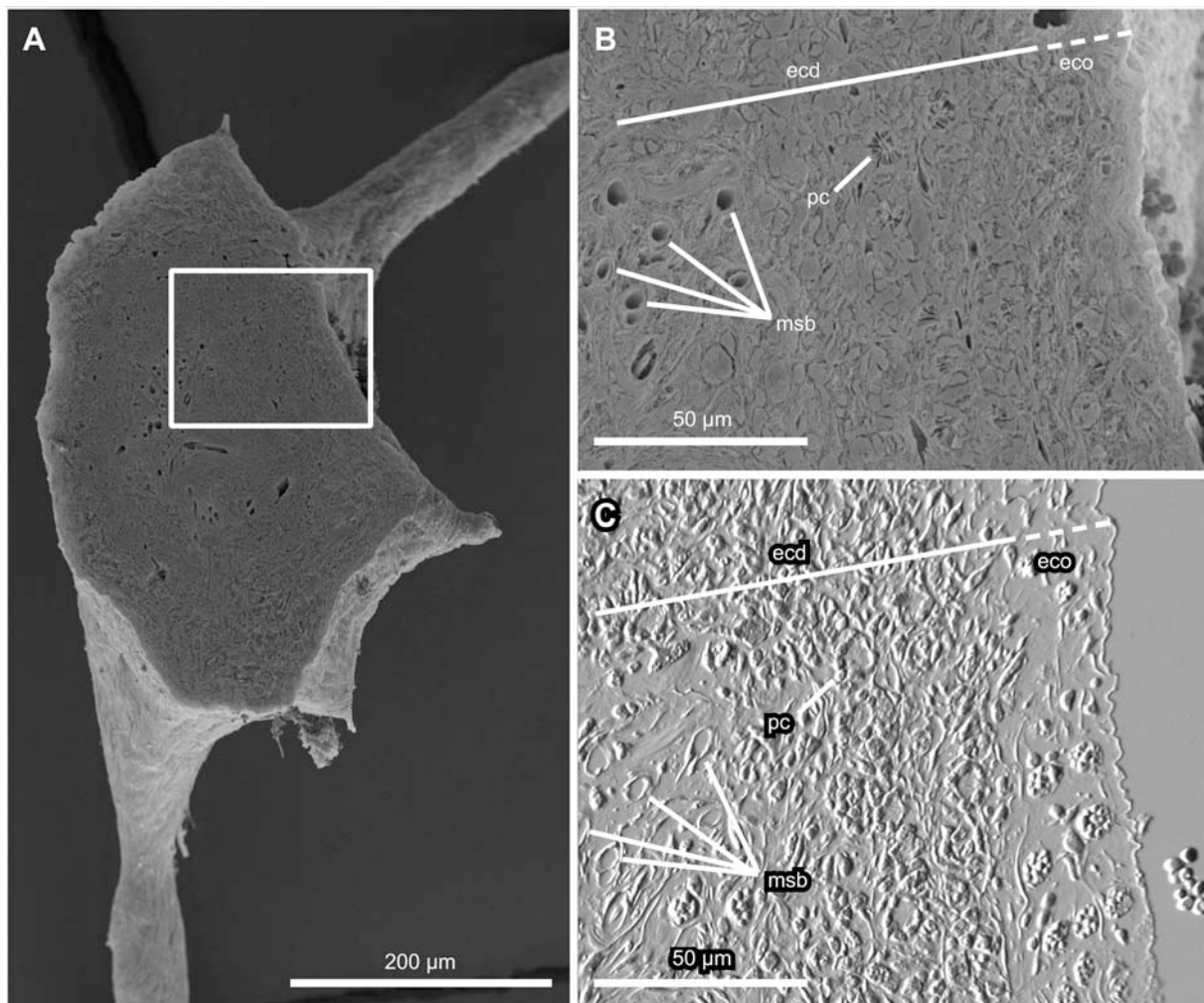
Es konnten zwei Typen desselben Stadiums analysiert werden. Der erste weist einen hohen Gewebeanteil bis zu 75,6 % auf, während der Anteil des Wasserleitungssystems maximal 28,7 % beträgt (Abbildung 21A-B). In diesem Stadium liegen die Zellen in der sich entwickelnden Knospe sehr dicht gepackt vor (Abbildung 22). Der zweite Typ zeigt eine gleichmäßige Verteilung von Gewebe und Wasserleitungssystemelementen (Abbildung 21C). In beiden Fällen sind Cortex und Choanosom noch nicht differenziert, ebenso wie Lakunen und Choanozytenkammern noch nicht zu finden sind (Abbildung 21A-C, Abbildung 22, Abbildung 25A-C). Der Volumenanteil der Skelettelemente ist innerhalb der gesamten Individuen annähernd konstant. Im Stiel, der die Knospe mit dem Mutterschwamm verbindet, erhöht sich jedoch der Anteil auf über 30 % (siehe Pfeil Abbildung 25C). Das Megasklerenbündel des Stiels definiert die Hauptachse des Knospenskeletts und damit auch der gesamten Knospe in diesem Stadium. Das generelle Erscheinungsbild der Knospen in diesem Stadium ist eher abgeflacht und lang gestreckt entlang der Hauptachse. Die weiteren Sklerenbündel des Skeletts sind in einer Ebene, die senkrecht zum Stiel orientiert ist, angeordnet (Abbildung 25A-C, Anhang 1 Film 3).



**Abbildung 22:** Korrespondierende REM- und DIC-mikroskopische Aufnahmen einer Stadium 1-Knospe von *T. wilhelma*. (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer mittig gelegenen Schnittebene. Der eingerahmte Bereich ist in (B) als rasterelektronenmikroskopische und in (C) als DIC-mikroskopische Aufnahme von korrespondierenden Semidünnschnitten vergrößert gezeigt. Deutlich ist die dichte Packung und gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erkennen.

## Stadium 2-Knospen

Stadium 2-Knospen sind noch immer mit dem Mutterschwamm über den Stiel verbunden (siehe Abbildung 25D-F), weisen aber schon eine eher kugelförmige Gestalt mit einem weiterentwickelten Skelett auf (Abbildung 25D-F). Eine der untersuchten Knospen zeigt ein auffällig weit entwickeltes Skelett, welches durch ein relativ gut entwickeltes Skelettzentrum und Megasklerenbündel, bestehend aus einer verhältnismäßig großen Anzahl von Skleren, gekennzeichnet ist (Abbildung 25D). Eine Trennung von Choanoderm und Cortex ist nur Ansatzweise in einem sehr frühen Stadium erkennbar. Im Bereich der Körperausläufer dominiert klar der Gewebeanteil gegenüber dem Anteil des Wasserleitungssystems (Abbildung 21D). Bei den weiteren untersuchten Knospen dieses Stadiums erstrecken sich die Megasklerenbündel in zusätzliche Richtungen als in Stadium 1, doch die Sklerenbündel und das Skelettzentrum sind noch nicht so hoch organisiert wie im adulten Skelett. Insgesamt weist das Skelett eine eher planare Sternform statt einer globulären Form auf. Die Cortex- und Choanodermregionen sind noch nicht differenziert (Abbildung 21E-F, Abbildung 23, Abbildung 25E-F), doch ist schon ein geringer Anstieg der Anteile des

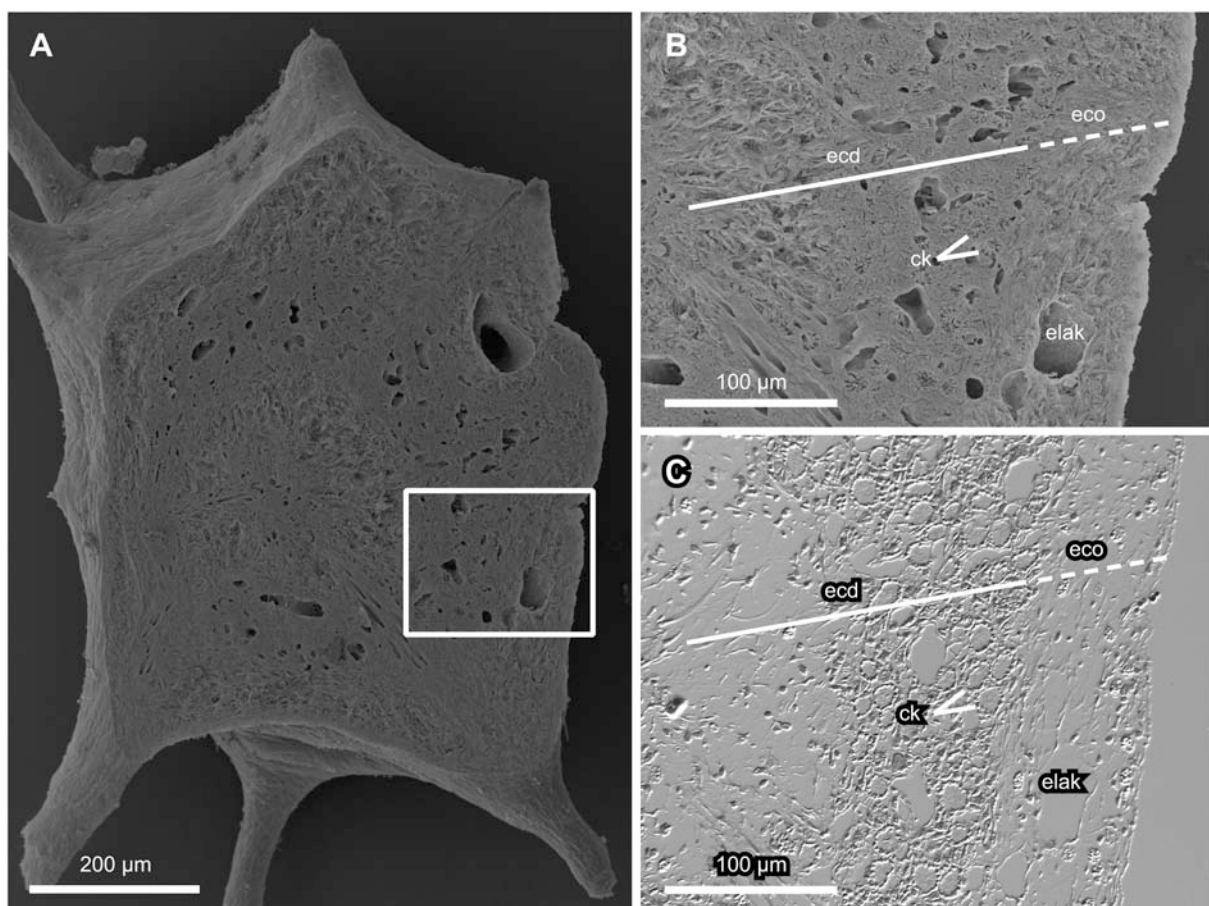


**Abbildung 23:** Korrespondierende REM- und DIC-mikroskopische Aufnahmen einer Stadium 2-Knospe von *T. wilhelma*. (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mittig gelegenen Schnittebene. Der eingerahmte Bereich ist in (B) als rasterelektronenmikroskopische und in (C) als DIC-mikroskopische Aufnahme von korrespondierenden Semidünnschnitten vergrößert gezeigt. Die Stadium 2-Knospen (B) zeigen Megasklerenbündel (msb), früh entwickelte Cortex- (eco) und Choanodermbereiche (ecd) und eine kleine Zahl von primordialen Choanozyten (pc).

Wasserleitungssystem, begleitet von einer Verringerung der Gewebsanteile in einem relativen Abstand größer als 20 % vom Zentrum zu erkennen. Die Knospe erscheint als ein Resultat der immer noch abgeflachten Anordnung des Skeletts dennoch leicht abgeflacht (Abbildung 25E-F).

### Stadium 3-Knospen

In Stadium 3-Knospen beginnt die Entwicklung ausgeprägter Lakunen im Cortex-Bereich und eines dichter gepackten Choanosoms um das Schwammzentrum herum (Abbildung 25G-H, Abbildung 24). Entsprechend sind in den Kurven der volumetrischen Analysen die ersten Maxima dieser beiden Strukturen erkennbar (Abbildung 21G-H). Die visuelle Inspektion von 2D-Schnittbildern und Volume Renderings weist auf die Anwesenheit von Choanozytenkammern im sich entwickelnden Choanosom hin (Abbildung 24). Das Skelettzentrum ist eindeutig zu erkennen und konzentriert sich auf einen einzigen Punkt (Abbildung 25G-H). Dies ist ebenfalls anhand der kleinen Maxima im Zentrum der Kurven der Volumenanalysen zu erkennen. Das Skelett erstreckt sich annähernd sternförmig in alle Raumrichtungen, behält aber immer noch eine leicht abgeflachte Form, die sich auch im äußeren Erscheinungsbild der Knospen widerspiegelt (Abbildung 25G-H). Auch die Stadium 3-Knospen sind weiterhin über den ursprünglichen Stiel mit dem Mutterschwamm verbunden.



**Abbildung 24:** Korrespondierende REM- und DIC-mikroskopische Aufnahmen einer Stadium 3-Knospe von *T. wilhelma*. (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mittig gelegenen Schnittebene. Der eingerahmte Bereich ist in (B) als rasterelektronenmikroskopische und in (C) als DIC-mikroskopische Aufnahme von korrespondierenden Semidünnschnitten vergrößert gezeigt. In den Stadium 3-Knospen finden sich entwickelnde Lakunen (elak) sowie getrennte, sich entwickelnde Choanoderm- (ecd) und Cortex-Bereiche (eco). Deutlich sind schon Choanozytenkammern (ck) zu erkennen.



### Stadium 4-Knospen (Jungschwämme - vom Mutterschwamm abgelöst)

Stadium 4-Knospen zeigen eine dem Adultus vergleichbaren Körperbau (Abbildung 5, Abbildung 25I-J, Abbildung 26). Das dichter gepackte Choanosom hebt sich deutlich vom umgebenden Cortex ab, der auffallend durch Lakunen geprägt ist. Innerhalb des Choanosoms findet sich eine große Zahl von differenzierten Choanozytenkammern (Abbildung 19A, Abbildung 26). Die Kurven der volumetrischen Analysen zeigen ein annähernd symmetrisches Muster für die beiden Kompartimente (Abbildung 21I-J). Dieses Kurvenmuster, das annähernd eine kugelförmige Morphologie darstellt, und das äußere Erscheinungsbild (Abbildung 25I-J, Anhang 1 Film 4) sind ein Resultat der Anordnung der Hauptskelettelemente. Die Anzahl der Megaskleren ist erhöht. Die Sklerenbündel verteilen sich gleichmäßig im Raum, sodass sie einen kugelförmigen Stern bilden (Abbildung 25I-J, Anhang 1 Film 4). Das Verteilungsmuster der anatomischen Strukturen in diesem Stadium ist dem in adulten Exemplaren vergleichbar.

Es konnten zwei Untertypen desselben Stadiums definiert werden (dargestellt als I und J in Abbildung 21 und Abbildung 25, siehe auch Abbildung 27). In beiden Fällen waren die Knospen bereits vom Mutterschwamm abgelöst. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Typen ist das Gesamtvolumen, welches von den Anteilen der Skelettelemente und Gewebe beeinflusst wird (Abbildung 27). Es ist in keinem der beiden Fälle möglich, die ursprüngliche Ansatzstelle des verbindenden Stiels zu identifizieren, da die Megaskleren in das neue Skelett integriert wurden (Abbildung 25I-J, Anhang 1 Film 4). Die größere der beiden Knospen (J in Abbildung 21 und Abbildung 25) ist charakterisiert durch eine größere Zellmasse, eine größere Anzahl an Megaskleren in den Megasklerenbündeln und eine Reihe von feineren Megaskleren, welche offensichtlich in der Knospe neu synthetisiert wurden (Abbildung 25J). Im Gegensatz dazu zeigt das kleinere Exemplar (I in Abbildung 21 und Abbildung 25) eine etwas geringere Biomasse und weniger auffallende Megasklerenbündel (Abbildung 25I). Auf der anderen Seite ist die Entwicklung des Wasserleitungssystems mit dem zuvor geschilderten Fall vergleichbar - und somit auch mit einem adulten Schwamm (Abbildung 21I-J, Abbildung 25I-J). Interessanterweise sind der Durchmesser und die Biomasse der in Abbildung 21I und Abbildung 25I gezeigten Knospen kleiner als in den Beispielen für die Stadien 2 bis 3. Der Entwicklungszustand einer Knospe kann somit nicht direkt anhand des Durchmessers bestimmt werden.

Nächste Seite ►►►

---

**Abbildung 25:** Projektionen, 3D-Volume-Renderings und entsprechende virtuelle Schnitte von *T. wilhelma*-Knospen basierend auf SR- $\mu$ CT-Datensätzen. Die ersten drei Spalten zeigen x-, y- und z-Projektionen entsprechend der drei Raumrichtungen der Datensätze von vier unterschiedlichen Entwicklungsstadien: Stadium 1 (A-C), Stadium 2 (D-F), Stadium 3 (G-H) und Stadium 4 (I-J). Die Entwicklung der hoch absorbierenden Skelettelemente kann von den frühen Stadien, in denen nur eine Hauptsymmetrieachse vorhanden ist, definiert durch den Stiel (Pfeil), bis in die späteren Stadien verfolgt werden, in denen sich die Megasklerenbündel und die sich entwickelnde Megastersphäre punktsymmetrisch zum Zentrum anordnen. Ab dem Stadium 3 (G) ist das sich entwickelnde Choanoderm vom sich entwickelnden Cortex zu unterscheiden und kann in der Entwicklung zum vollständig differenzierten Choanoderm in Stadium 4 (J) verfolgt werden. In den Spalten 4 und 5 sind Volume Renderings und virtuelle Schnitte gezeigt, die die Entwicklung von bestimmten morphologischen Strukturen verdeutlichen. (A-C) Stadium 1-Knospe ohne Choanoderm-/Cortex-Differenzierung (msb – Megasklerenbündel), (D-F) Stadium 2-Knospe ohne abgetrenntes Choanoderm (ecd – sich entwickelndes Choanoderm, eco – sich entwickelnder Cortex) aber mit ersten gebildeten Kanälen des Wasserleitungssystems, (G-H) Stadium 3-Knospe mit früh entwickeltem Choanoderm (ecd) und sich entwickelndem Cortex (eco), (I – J) Stadium 4-Knospen mit differenzierten Choanoderm- (cd) und Cortex- (co) Bereichen und deutlich erkennbaren Lakunen (J) (basierend auf Hammel *et al.* 2009).

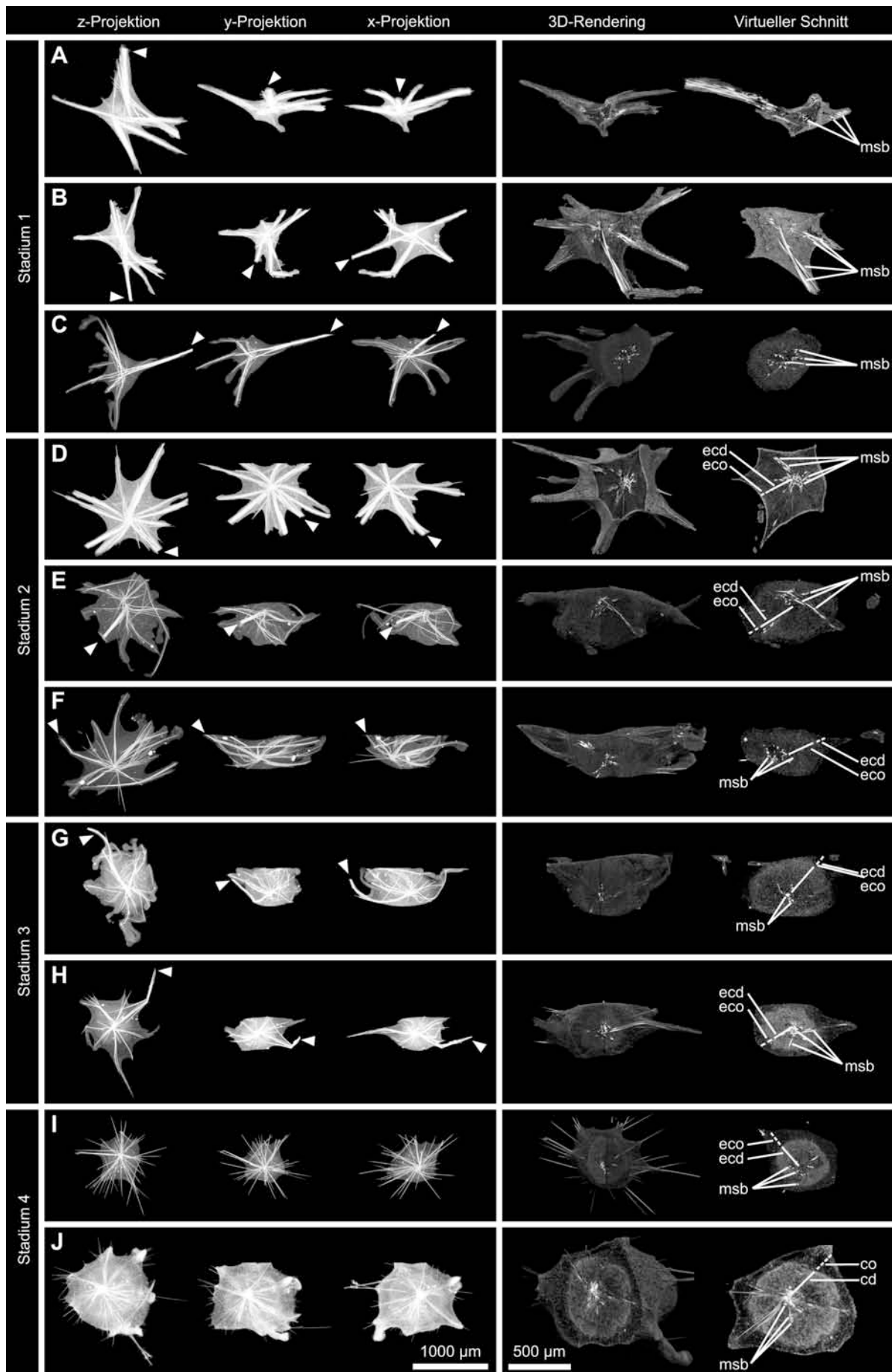
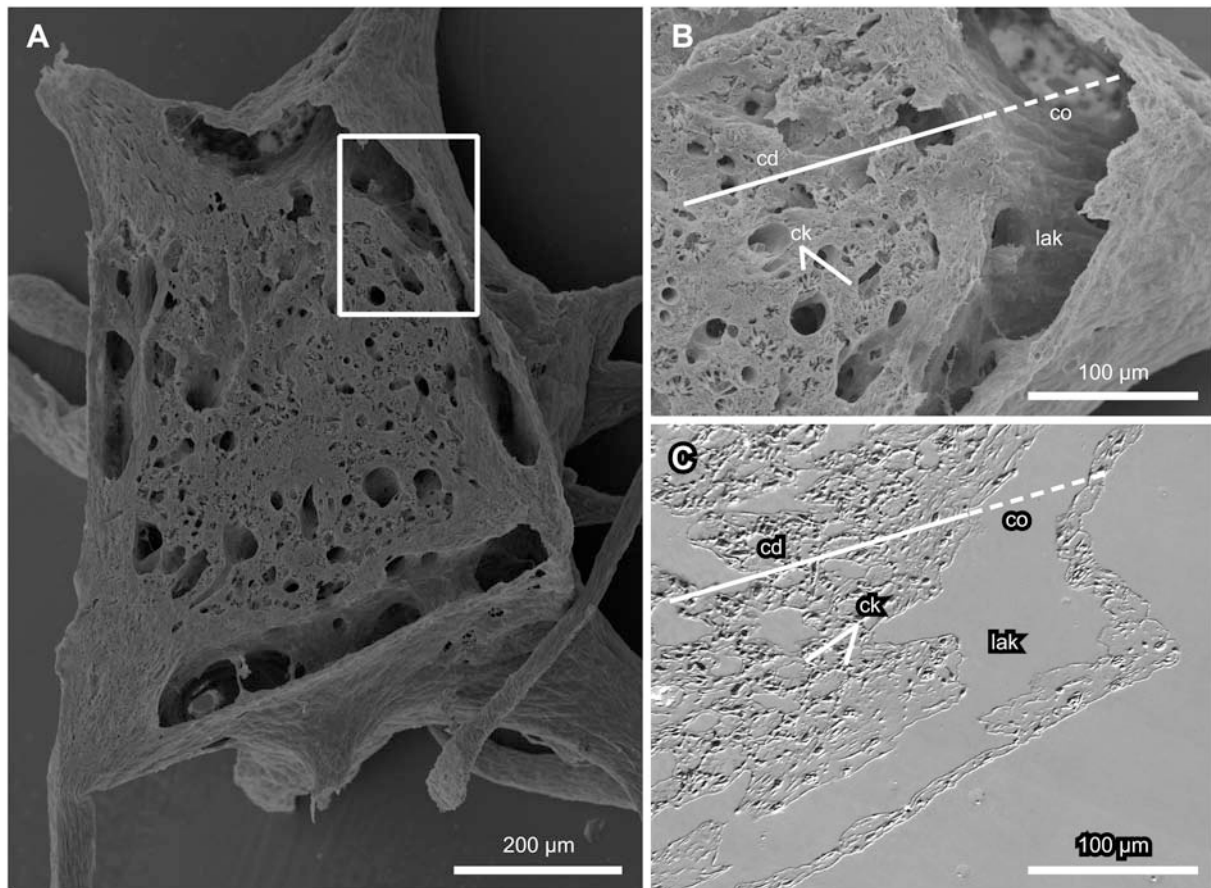
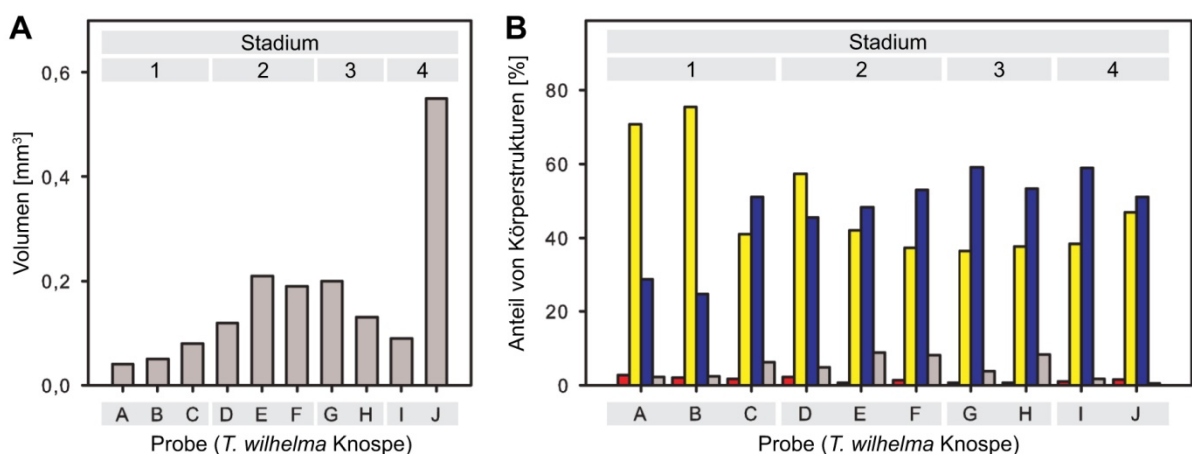


Abbildung 25: Legende siehe vorhergehende Seite.



**Abbildung 26:** Korrespondierende REM- und DIC-mikroskopische Aufnahmen einer Stadium 4-Knospe von *T. wilhelma*. (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mittig gelegenen Schnittebene. Der eingerahmte Bereich ist in (B) als rasterelektronenmikroskopische und in (C) als DIC-mikroskopische Aufnahme von korrespondierenden Semidünnschnitten vergrößert gezeigt. In Stadium 4-Knospen (D) sind deutlich entwickelte Lakunen (lak), Choanozytenkammern (ck) und unterscheidbare Cortex- (co) und Choanoderm-Bereiche (cd) vorhanden.



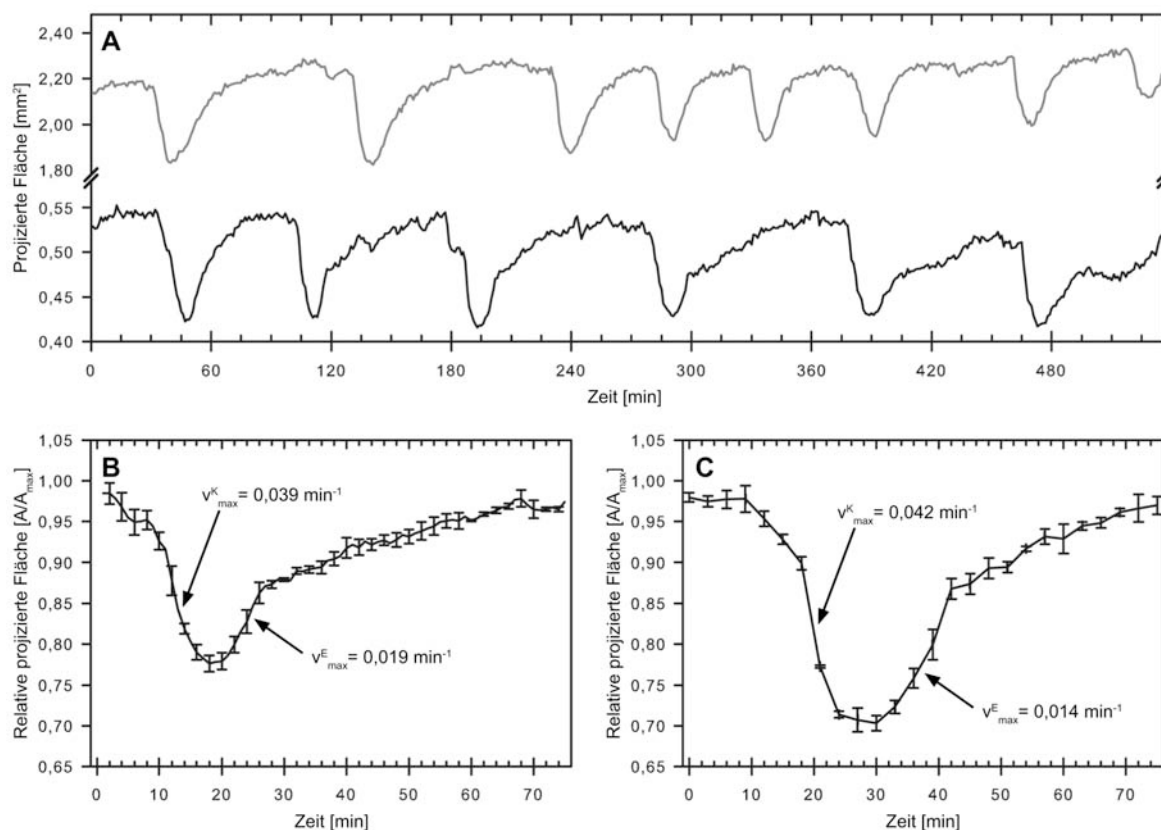
**Abbildung 27:** Ergebnisse der volumetrischen Analyse von Knospen. (A) Vergleich der Körpergrößen anhand der Gesamtvolumina. (B) Verteilung der Anteile von Körperstrukturen in den einzelnen Knospenstadien: Skelett (rot), Gewebe (gelb), Wasserleitungssystem (blau) und „unzugeordnete“-Anteile (grau) normalisiert auf das Gesamtvolumen. „unzugeordnete“-Anteile: Diese beinhalten eine kleine Anzahl von Voxel innerhalb der Knospe die nicht eindeutig einer der funktionellen morphologischen Strukturen zugeordnet werden konnten.



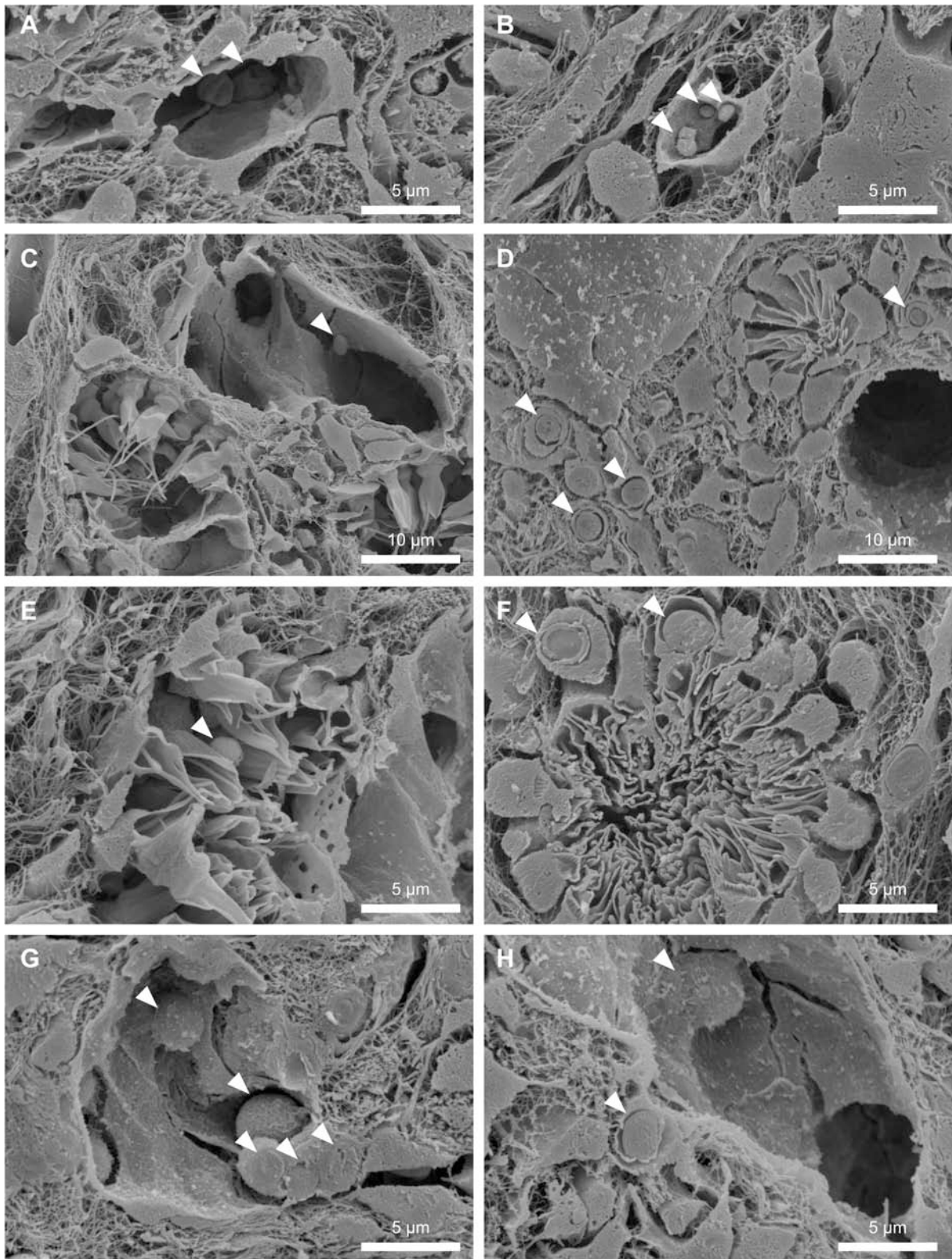
#### 4.1.5 Kontraktionsfähigkeit und Funktionalität des Wasserleitungssystems in Stadium 4-Knospen

Knospen von *T. wilhelma*, die sich vom Mutterschwamm abgelöst (Stadium 4) und am Untergrund angeheftet haben, zeigen regelmäßige Körperkontraktionen (Abbildung 28A). Wie in adulten Individuen von *T. wilhelma* (Nickel 2004) ist die Rhythmik einzelner Knospen individuell (Abbildung 28A) und über lange Zeit gesehen variabel. Anhand von gemittelten Kurvenverläufen eines Individuums wurde die Kinetik der Kontraktion in Knospen ermittelt. Hierfür wurden die einzelnen Kurvenverläufe auf die maximale projizierte Körperoberfläche normalisiert. Im Verlauf der Kontraktion der Knospen wird eine maximale Geschwindigkeit von  $0,039 \text{ min}^{-1}$  erreicht. Die Expansion verläuft langsamer und erreicht eine maximale Geschwindigkeit von  $0,019 \text{ min}^{-1}$  (Abbildung 28B). In einem adulten Individuum wurden die Maximalwerte von  $0,042 \text{ min}^{-1}$  für die Kontraktion und  $0,014 \text{ min}^{-1}$  für die Expansion bestimmt (Abbildung 28C).

Neben der Kontraktionsfähigkeit stellt auch die Fähigkeit zur eigenständigen Nahrungsaufnahme, die durch die Aufnahme eingestrudelter Nahrungspartikel erfolgt, einen kritischen Punkt hinsichtlich der vollständigen Funktionalität des Jungschwamms dar und belegt das Vorhandensein eines funktionalen Wasserleitungssystems. Um dies zu überprüfen, wurden



**Abbildung 28:** Kontraktionszyklen in *T. wilhelma*. (A) Langzeitanalyse der projizierten Körperoberfläche zweier Stadium 4-Knospen (juvener Schwämme) mit regelmäßigen Kontraktionen und individueller Rhythmik. (B) Gemittelte Kontraktionskinetik einer Stadium 4-Knospe, dargestellt als relative projizierte Körperoberfläche über die Zeit mit maximalen Kontraktions- und Expansionsgeschwindigkeiten. (C) Gemittelte Kontraktionskinetik eines adulten Individuums von *T. wilhelma* mit maximalen Kontraktions- und Expansionsgeschwindigkeiten.



**Abbildung 29:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Wasserleitungssystemelementen in Stadium 4-Knospen von *T. wilhelma* zwei Stunden (A-F) und vier Stunden (G-H) nach der Fütterung mit Hefezellen (Pfeil). Freie Hefen in kleineren (A-B) und größeren Kanälen (C). Im Choanosom phagozytierte und noch unverdaute Hefen (D). Choanozytenkammer mit Apopyle und Hefezelle im Inneren (E). Choanozyten mit phagozytierten Hefezellen (F). Freie Hefen, sich in Phagozytose befindende und bereits phagozytierte Hefen, die von Endopinacozyten der Kanalwände aufgenommen werden (G-H).

Stadium 4-Knospen von *T. wilhelma* mit einer Suspension von Hefezellen gefüttert und anschließend am Rasterelektronenmikroskop auf ingestierte Hefen untersucht. Die verfütterten Hefen wiesen je nach Entwicklungsstadium einen Durchmesser von bis zu 5 µm auf. In den Knospen konnten Hefen mit einem Durchmesser von bis zu 4 µm gefunden werden, wobei der größte Teil der aufgenommenen Hefen einen Durchmesser von 2 µm aufwies. Verschiedene Faktoren führen zu einer Größenselektion der Hefen, die aufgenommen werden können. Hierzu zählen die Durchmesser der Ostia (Einstromöffnungen), die Kanaldurchmesser und für den Nachweis der Hefen in Choanozytenkammern auch der Durchmesser der Prosopylen (Einstromöffnungen der Choanozytenkammern).

In den untersuchten Knospen konnten Hefen in Kanälen unterschiedlichen Durchmessers nachgewiesen werden (Abbildung 29A-C). Weiterhin waren diese in Choanozytenkammern nachweisbar (Abbildung 29E) und wurden dort von Choanozyten aufgenommen (Abbildung 29F). Es konnte ebenfalls eine direkte Phagozytose der Hefezellen durch Endopinacozyten in den Kanälen beobachtet werden (Abbildung 29G-H). Im Mesohyl wurden Zellen detektiert, die eindeutig Hefezellen aufgenommen hatten (Abbildung 29D). Es konnte jedoch nicht eindeutig festgestellt werden, ob diese Hefezellen von Choanozyten oder Endopinacozyten phagozytiert wurden.

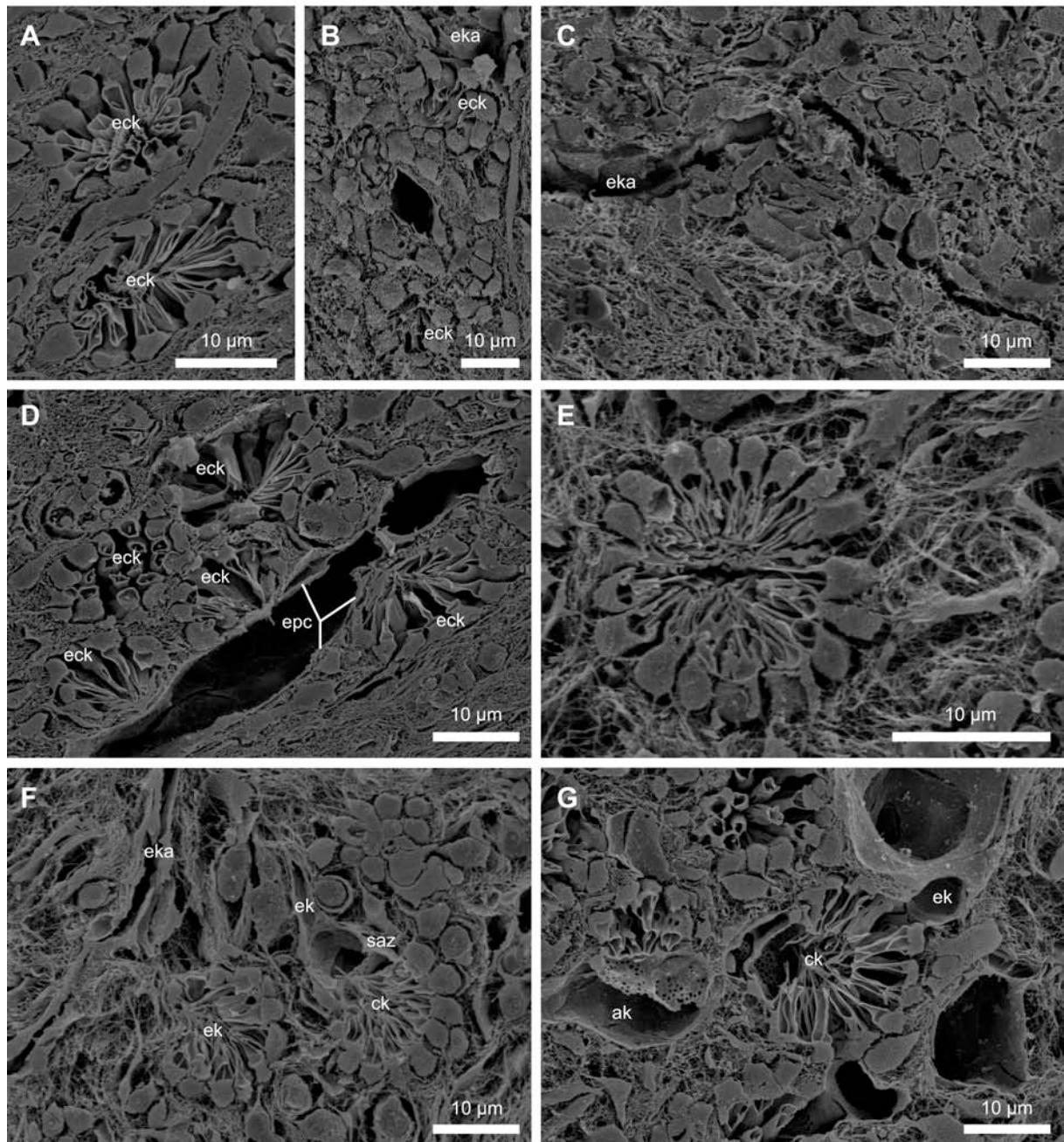
#### 4.1.6 Entwicklung des Wasserleitungssystems

Die Entwicklung von Kanälen und Choanozytenkammern in Knospen wurde anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen untersucht. In den frühesten Knospenstadien konnten dicht gepackte Choanozytenkammern beobachtet werden (Abbildung 30A-B). Diese weisen eine stark abgeflachte Form und keine Verbindung zu Kanälen auf. In der Regel konnten in diesem Stadium, mit einer Ausnahme, keine Kanäle in den Knospen beobachtet werden. Die einzige Knospe dieses Stadiums, in der eindeutig Kanäle vorzufinden waren, wies keine Verbindungen der Kanäle zu Choanozytenkammern auf. Früh entwickelte Kanäle in Knospen späterer Entwicklungsstadien zeigten oft einen stark abgeflachten Querschnitt (Abbildung 30B-C). Endopinacozyten, die die sich entwickelnden Kanäle auskleiden, wiesen zum Teil noch wesentlich dickere Zellkörper im Vergleich zu den sehr dünnen Zellkörpern von Endopinacozyten in Schwämmen mit voll entwickeltem Wasserleitungssystem auf (Abbildung 30C,F).

In späteren Stadien konnten die immer noch dicht gepackten und abgeflachten Choanozytenkammern in direkter Nachbarschaft zu Kanälen beobachtet werden (Abbildung 30D). An der der Kanalwand zugewandten Seite der Choanozytenkammern waren teilweise Zellen erkennbar, die eindeutig keine Choanozyten darstellen, aber die eventuell an der Ausbildung der Prosopyle beteiligt sind.

In späteren Knospenstadien konnten bereits abgerundete, jedoch noch dicht gepackte Choanozytenkammern beobachtet werden. Diese zeigten meist keine Verbindung zu Kanälen, sofern in den untersuchten Knospen dieses Stadiums überhaupt Kanäle gefunden wurden.

In Knospen, die kurz vor der Ablösung vom Mutterschwamm standen, konnten einzelne, voll funktionsfähige Choanozytenkammern beobachtet werden. In der Prosopyle derselben fanden sich wie in adulten Exemplaren siebartige Zellen (Abbildung 30F). In Knospen desselben Stadiums waren aber auch noch abgerundete, dicht gepackte Choanozytenkammern zu finden, für die keine Verbindung zu Kanälen nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 30:** Unterschiedliche Entwicklungsstadien von Choanozytenkammern und Kanälen. (A) Dicht gepackte und stark komprimierte Choanozytenkammer (eck) in einem frühen Entwicklungsstadium. (B) Sehr dicht gepackte Choanozytenkammer neben einem sich entwickelnden Kanal (eka), jedoch ohne Verbindung zu diesem. (C) Neu entstehender Kanal (eka) in einer Knospe von *T. wilhelma*. (D) In Entwicklung befindliche Choanozytenkammern (eck), die weniger dicht gepackt und teilweise abgerundet erscheinen, direkt neben einem Kanal, zu dem noch keine Verbindung besteht. Die Endopinacozyten (epc) kleiden den Kanal vollständig aus, Apopylen oder Prosopylen sind nicht vorhanden. (E) Abgerundete Choanozytenkammer in einem späten Entwicklungsstadium, jedoch ohne Verbindung zu einem Kanal. (F) Funktionelle Choanozytenkammer (ck) mit einer siebartigen Zelle (saz) in der Prosopyle und Verbindung zu einem ausführenden Kanal (ek). Daneben eine fast vollständig entwickelte Choanozytenkammer direkt neben einem sich entwickelnden Kanal (eka), jedoch ohne Verbindung zu diesem. (G) Funktionelle Choanozytenkammer in einem Jungschwamm mit Verbindung zu einführendem und ausführendem Kanalsystem.

Vom Mutterschwamm abgelöste Jungschwämme zeigten voll funktionsfähige Choanozytenkammern. Über Apopylen sind diese in den Jungschwämmen mit einführenden Kanälen verbunden (Abbildung 30G). Das zentrale Lumen der Choanozytenkammern erscheint größer als in den früheren Knospenstadien. In der Prosopyle, die die Choanozytenkammern mit ausführenden Kanälen verbindet, fanden sich monocilierte Konuszellen (Abbildung 30G, vgl. Abbildung 34D) und siebartige Zellen (Abbildung 30G, vgl. Abbildung 34E).

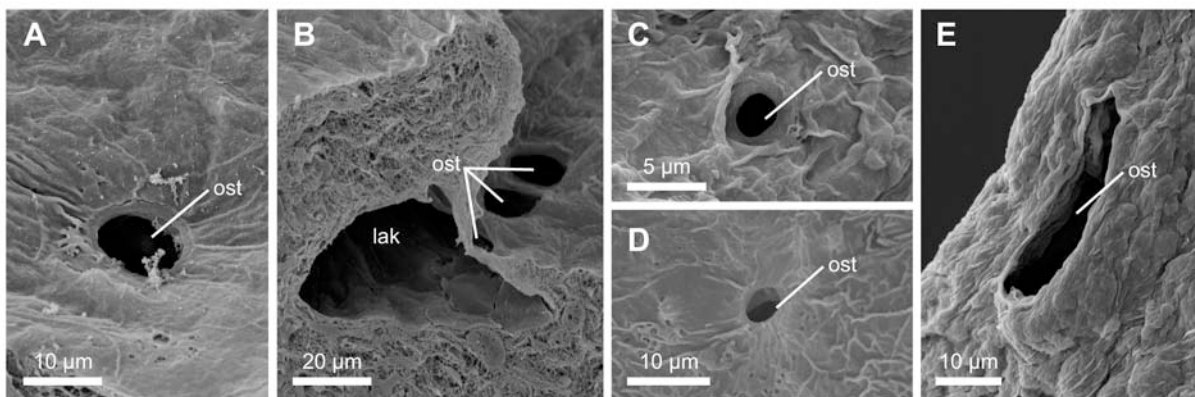
## 4.2 Das Wasserleitungssystem adulter Individuen von *Tethya wilhelma*

### 4.2.1 Zellulärer Aufbau des Wasserleitungssystems

#### Einführendes Wasserleitungssystem

Die zellulären Strukturen, die an der Ausbildung des Wasserleitungssystems in *T. wilhelma* beteiligt sind, sollen im Folgenden entlang der Fließrichtung des Wassers, in der dieses den Schwammkörper passiert, betrachtet werden. Über Einstromöffnungen (Ostia) auf der Schwammoberfläche gelangt das Wasser in die darunter gelegenen Lakunen (Abbildung 31A-E, Abbildung 32A). Die Ostia weisen je nach Öffnungszustand im Mittel Durchmesser von 3  $\mu\text{m}$  bis 14,5  $\mu\text{m}$  auf. In geringerer Anzahl sind auch größere Ostia bei *T. wilhelma* zu finden (Abbildung 31E). Sie stellen eine Grenze zwischen Exo- und Endopinacoderm dar. Kleinere Ostia werden von einer einzelnen Porozyte (Abbildung 31C-D), größere von mehreren Zellen gemeinsam gebildet (Abbildung 31A-B, E). Die Grenzfläche, an der Endo- und Exopinacozyten aneinanderstoßen, konnte in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht eindeutig bestimmt werden. Auf der im Schwamminneren gelegenen Seite eines Ostiums konnte ein sich anschließender Kanal beobachtet werden, dessen Wände von Zellen ausgekleidet ist (Abbildung 31D-E). Dieser bildet damit einen durchgehenden Abschluss zum Mesohyl. Ob es sich bei diesen Zellen um Endo- oder Exopinacozyten handelt, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

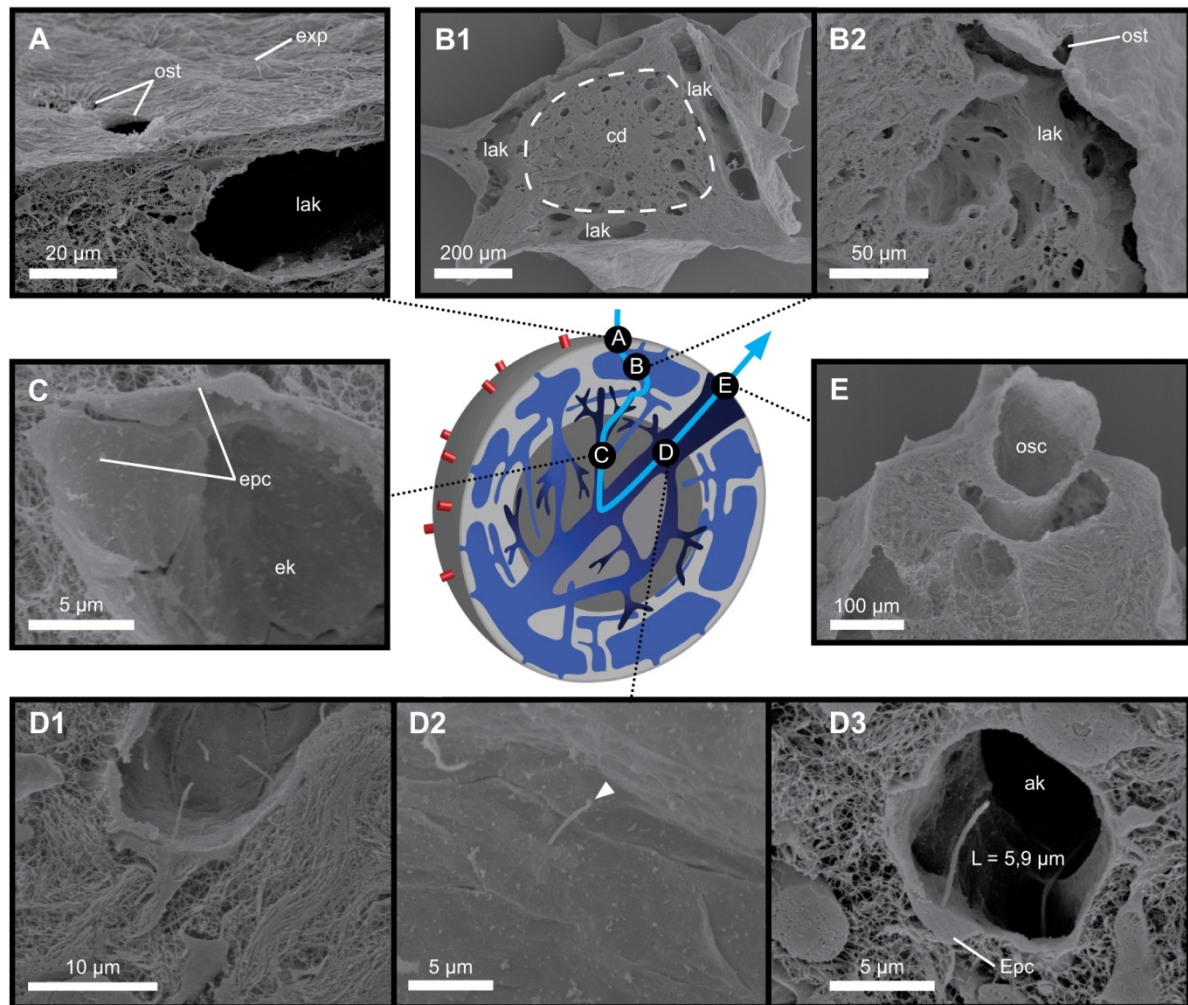
Die Lakunen, die sich im Cortex direkt unter der Oberfläche ausdehnen, umschließen das Choanosom im Schwammzentrum (Abbildung 32B). Von hier aus gelangt das einströmende Wasser über größere und kleinere Kanäle in das Choanoderm. Die Kanäle des einführenden Wasserleitungssystems sind von Apendopinacozyten ausgekleidet. Diese sind durchgehend



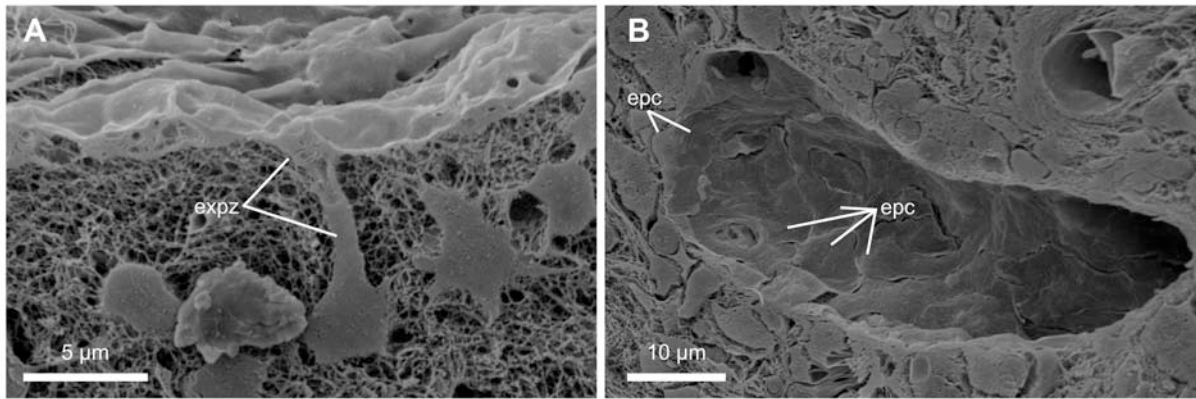
**Abbildung 31:** Ostia unterschiedlicher Größe im Exopinacoderm von *T. wilhelma*. Die Ostia mit größerem Durchmesser werden von mehreren Zellen gebildet (A-B, E) und stehen in direkter Verbindung mit darunter liegenden Lakunen (lak) (B). Ostia mit kleinerem Durchmesser werden von einzelnen Porozyten gebildet (C-D).



nahezu weniger als  $0,5\ \mu\text{m}$  dick und bilden den Abschluss der Kanäle zum Mesohyl. Lediglich im Bereich des Zellkerns verdickt sich der Zellkörper (Abbildung 32C). Im Gegensatz zur T-förmigen bzw. schirmförmigen Morphologie von Exopinacozyten, die den Schwamm an der äußeren Oberfläche abschließen, bei denen der Zellkern in einem Ausläufer ins Mesohyl verlagert ist und der Rest der Zelle sich schirmartig darüber aufspannt, weisen die Endopinacozyten des einführenden Wasserleitungssystems stets eine durchgehend flache Morphologie ohne einen ins Mesohyl verlagerten Ausläufer mit Zellkern auf (Abbildung 33).



**Abbildung 32:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Strukturen des Wasserleitungssystems von *T. wilhelma* und Schema des Wasserflusses mit Aufbau des Kanalsystems (Mitte, verändert nach Nickel et al. 2006b). Einstromöffnungen (Ostia - ost) auf der Oberfläche bilden Poren im Exopinacoderm (exp), über die das einströmende Wasser in den Schwamm gelangt (A). Sie stehen in direkter Verbindung mit darunter befindlichen Lakunen (lak) (A-B). Diese erstrecken sich in weiten Teilen im Cortex und umschließen das Choanoderm (cd) (B1). Detailaufnahme einer Lakune mit direkter Verbindung zu einem Ostium und mit großem einführenden Kanal, der ins Zentrum des Schwamms führt (B2). Detailaufnahme von Prosendopinacozyten, die einen einführenden Kanal (ek) auskleiden (C). Monocilierte Apendopinacozyten (D) in einem Kanal des ausführenden Wasserleitungssystems (Übersicht und Detailaufnahmen). Anschnitt des Osculum (osc) (E).

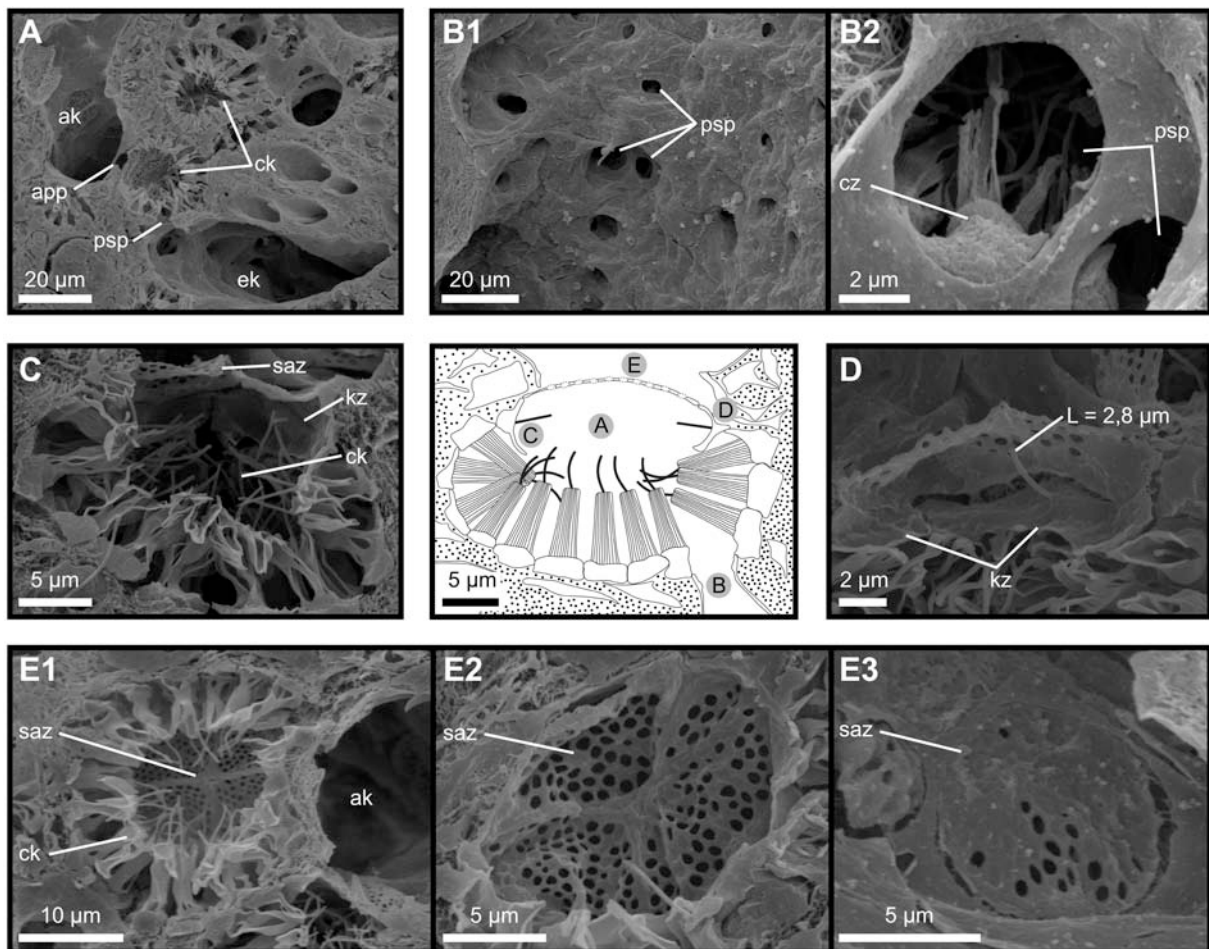


**Abbildung 33:** (A) T-förmige Exopinacozyte (expz) mit ins Mesohyl verlagertem Zellkörper, der den Nucleus enthält. (B) Prosendopinacozyten (epc), die einen einführenden Kanal auskleiden. Der Zellkörper mit Nucleus befindet sich annähernd in derselben Ebene wie die gesamte Zelle.

### Aufbau der Choanozytenkammern

Über Prosopylen, die eine Pore in der Kanalwand der einführenden Kanäle bilden, gelangt das Wasser in die Choanozytenkammern (Abbildung 34A-B). Die pinacozytischen Prosopylen weisen in *T. wilhelma* typischerweise einen Durchmesser von rund 7,4 µm auf und werden von einer einzelnen Zelle, einer Porozyte des Prosendopinacoderm, gebildet (Abbildung 34B2). Auf der Seite der Choanozytenkammern stehen die Porozyten in direktem Kontakt mit angrenzenden Choanozyten. Eindeutig ausgebildete choanozytische Prosopylen konnten nicht nachgewiesen werden. Die sphärisch bis annähernd sphärischen Choanozytenkammern werden von einer unterschiedlichen Anzahl an Choanozyten gebildet, die von der Größe der Kammern abhängt. Über die Apopyle verlässt das Wasser die Choanozytenkammer in einen ausführenden Kanal (Abbildung 34A). Die choanozytische Prosopyle wird von Konuszellen, die ein einzelnes Cilium von 3 µm Länge tragen, gebildet. Diese formen mit einem langen, flachen Ausläufer des Zellkörpers, der in das Lumen der Choanozytenkammer ragt, eine ringförmige Verengung der Ausstromöffnung (Abbildung 34C-D). Im Querschnitt weisen die Konuszellen annähernd eine Y-Form auf. Mit dem Zellkörper schließen sie an der Choanozytenkammer zugewandten Seite direkt an die benachbarten Choanozyten an (Abbildung 34B2). Auf der der pinacozytischen Apopyle zugewandten Seite grenzen die Konuszellen an eine oder mehrere Zellen, die eine siebartige Struktur über der Apopyle bilden, an. Typischerweise wird diese siebartige Struktur, die Poren von durchschnittlich 0,5 µm aufweist, von einer bis vier Zellen gebildet (Abbildung 34E). Die Poren, die von den einzelnen Zellen geformt werden und zur Ausbildung der siebartigen Struktur führen, können in geöffneter und geschlossener Form vorliegen (Abbildung 34E).

Die Anzahl der Zellen, die an der Ausbildung der siebartigen Struktur beteiligt sind, ist vom Durchmesser der Apopyle abhängig. Die Pore der Apopyle selbst wird von einer oder mehreren Porozyten des Apendopinacoderm gebildet (Abbildung 34E3). Über die von den Porozyten gebildeten Durchlässe spannen sich die siebartigen Zellen. Sie weisen nur eine sehr geringe Kontaktfläche zu den Porozyten auf und stoßen mit ihrem dünnen Zellkörper direkt an den Rand der gebildeten Poren an.

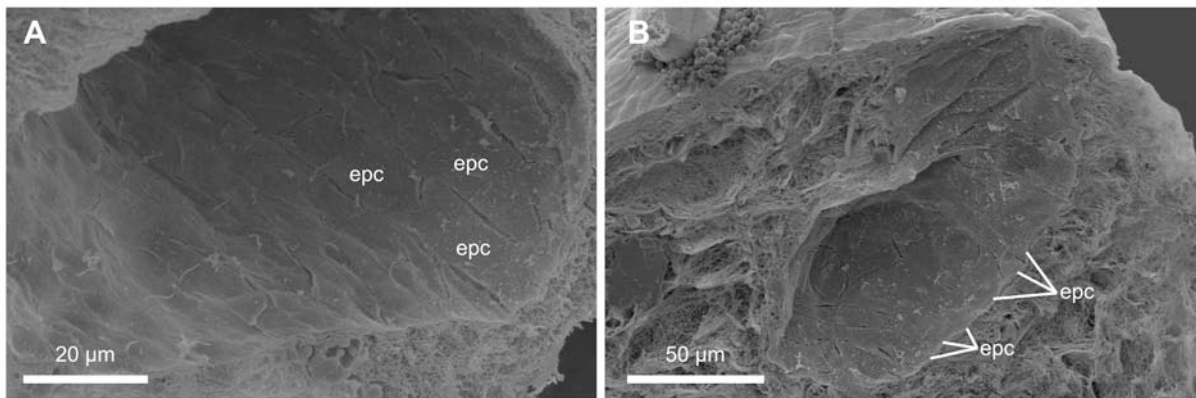


**Abbildung 34:** Schematischer Aufbau einer Choanozytenkammer von *T. wilhelma* (Mitte) und rasterelektronenmikroskopische Übersichts- und Detailaufnahmen von Choanozytenkammern. (A) Funktionelle Choanozytenkammer (ck) im Choanosom mit angeschnittener Prosopyle und Apopyle (app), die die Verbindung mit dem einführenden Kanal (ek) und ausführenden Kanal (ak) herstellen. (B1) Prosopyle (psp) in einem einführenden Kanal, die die Einstromöffnungen in die Choanozytenkammern bilden. (B2) Detailaufnahme einer Prosopyle, die eine Choanozyte (cz) der dahinterliegenden Choanozytenkammer erkennen lässt. (C) Konuszellen (kz), die eine ringförmige Verengung in der Apopyle der Choanozytenkammer (ck) schaffen, mit angeschnittener siebartiger Zelle (saz). (D) Detailaufnahme von monocilierten Konuszellen. (E1) Funktionelle Choanozytenkammer mit einer siebartigen Zelle (saz) im Hintergrund, die die Apopyle der Choanozytenkammer zum ausführenden Kanal hin abschließt. Siebartige Zelle mit geöffneten Poren (E2) und teilweise geschlossenen Poren (E3).

### Ausführendes Wasserleitungssystem

Über die Apopylen gelangt das Wasser in Kanäle des ausführenden Wasserleitungssystems. Kleinere Kanäle münden in einen oder mehrere zentrale ausführende Kanäle, die das Wasser über die Ausstromöffnung (Osculum) entlassen (Abbildung 32E). Die Kanalwände des ausführenden Wasserleitungssystems sind mit Apendopinacozyten ausgekleidet, von denen im Bereich des Atriums alle ein einzelnes Cilium tragen (Abbildung 32D). Die Cilien in *T. wilhelma* besitzen eine Länge von bis zu 5,9 µm. Wie Exopinacozyten weisen die monocilierten Apendopinacozyten einen T-förmigen Zellkörper auf (Abbildung 32D1, vgl. Abbildung 33A). Die lang gestreckten monocilierten Apendopinacozyten sind in Abschnitten des Atriums entweder einheitlich längs oder quer zum Verlauf des Kanals orientiert (Abbildung 35).



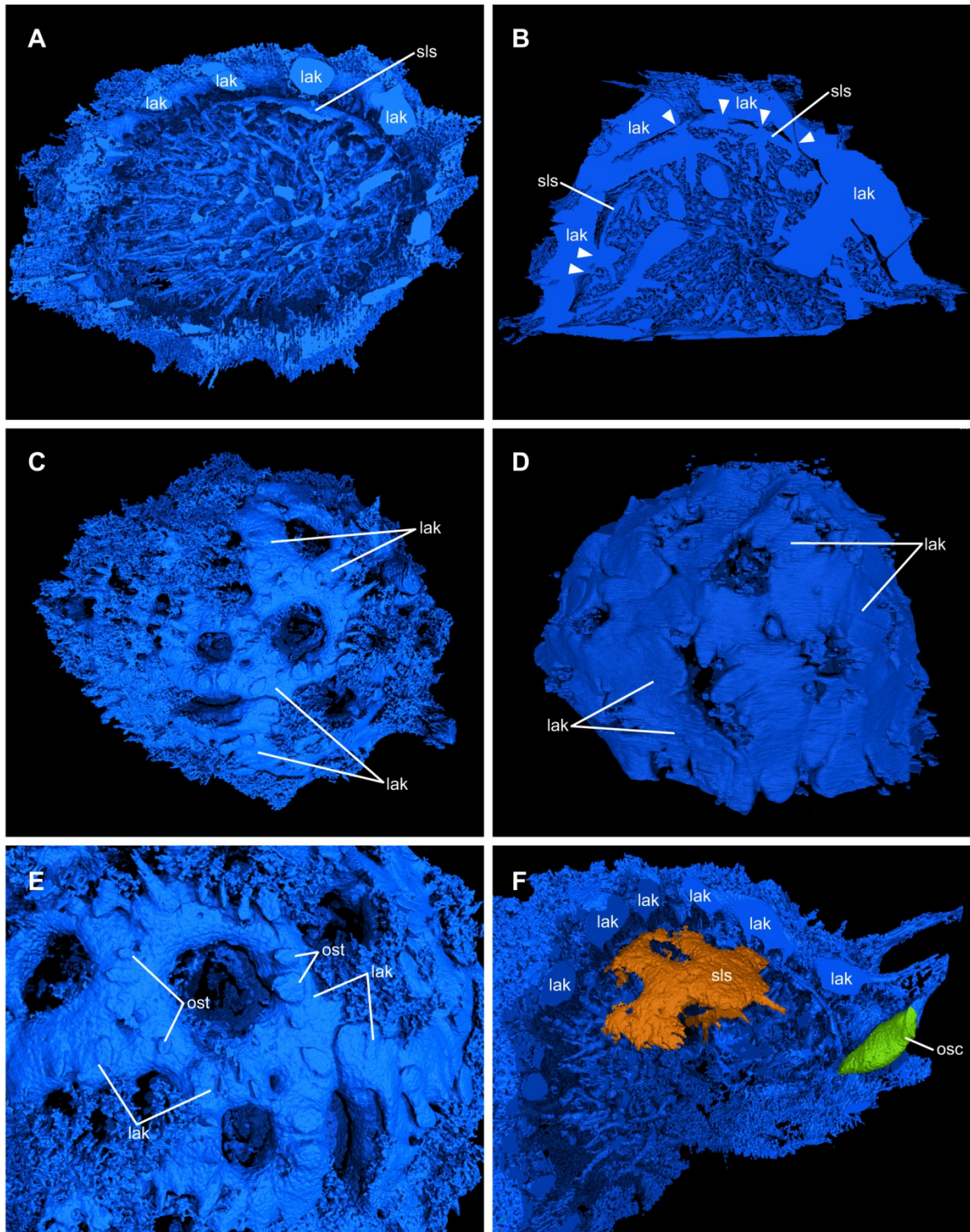


**Abbildung 35:** Monocilierte Apendopinacozyten (epc) in den Kanalwänden des Oscularrohrs. Die Zellen sind lokal einheitlich längs (A) oder quer (B) zum Verlauf des Kanals orientiert.

#### 4.2.2 Topologie des Wasserleitungssystems

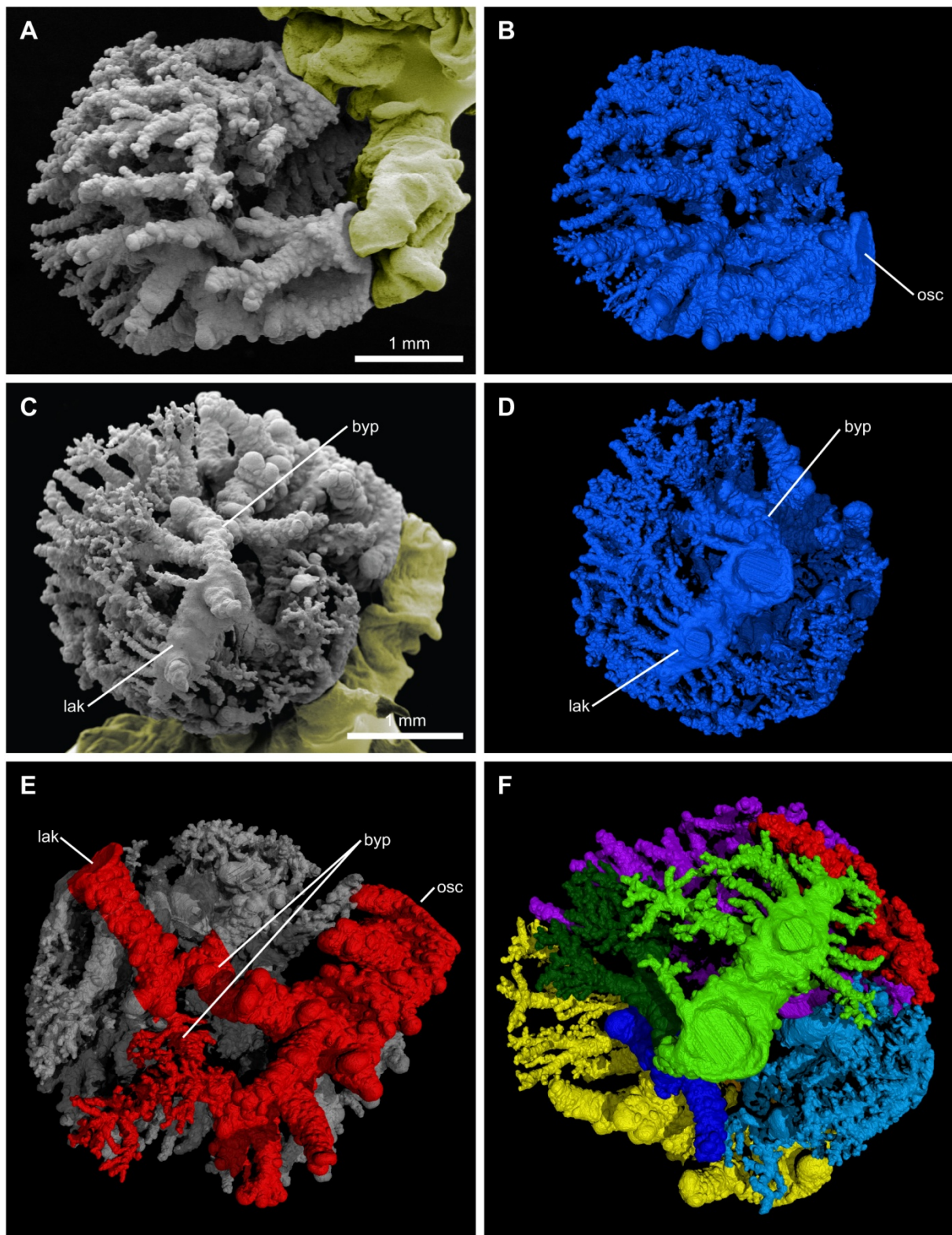
Anhand von 3D-Rekonstruktionen von Kanalsystemabgüssen wurde die Topologie des Wassereileitungssystems in *T. wilhelma* untersucht. Hierfür wurden virtuelle Kanalsystemabgüsse von adulten und juvenilen Schwämmen, basierend auf mikrotomografischen Datensätzen von vollständigen Individuen angefertigt, indem die Bereiche des Wasserleitungssystems aus den Datensätzen extrahiert wurden (Abbildung 36). Von adulten Individuen wurden ebenfalls Kanalsystemabgüsse durch Injektion von Kunstharz in das Osculum erzeugt, von denen ebenfalls 3D-Rekonstruktionen basierend auf mikrotomografischen Datensätzen erstellt wurden (Abbildung 37).

Im Kanalsystemabguss eines juvenilen Schwammes zeigt sich ein dichtes Netzwerk von größeren und kleineren Kanälen im Choanosom (Abbildung 36A). Diese stehen in direkter Verbindung mit dem Sublakunarsystem. Dieses erstreckt sich weiträumig im Grenzbereich zwischen Choanosom und Cortex auf der Seite des Choanosoms (Abbildung 36F). Die Lakunen des Sublakunarsystems bilden ein Netzwerk aus stark abgeflachten großen Kanälen (Abbildung 36F). Im Vergleich zu den großen Lakunen im Cortex weisen die Lakunen des Sublakunarsystems eine stärker abgeflachte Form auf. Die Lakunen des Cortex bilden, wie die Lakunen des Sublakunarsystems, ebenfalls ein großflächiges Netzwerk, welches den gesamten Jungschwamm umspannt (Abbildung 36C). In der in Abbildung 36C gezeigten Ansicht sind Bereiche des Lakunennetzwerkes im Cortex von einem feinen Netzwerk überdeckt und daher nur teilweise sichtbar. Bei diesem feinen Netzwerk handelt es sich um die Zwischenräume die sich im Kollagennetzwerk des Mesohyl, welches sich noch zwischen den Lakunen und der Schwammoberfläche befindet, bilden (vgl. Abbildung 19). Diese stellen ein Rekonstruktionsartefakt dar, das auf Rauschen im Datensatz und die Auflösungsgrenze zurück geht. Auf der Oberfläche des Lakunennetzwerkes zeigen sich Erhebungen, die als Ostienfelder identifiziert wurden (Abbildung 36E, vgl. Abbildung 31B). Einzelne Ostia konnten aufgrund der Auflösung der Mikrotomografiedaten nicht identifiziert werden. Kanäle, die das Lakunensystem mit dem Sublakunarsystem verbinden, konnten im Kanalsystemabguss des Jungschwammes nicht identifiziert werden. Ausgehend von Lakunen konnten Kanäle mit kleinem Durchmesser verfolgt werden, die in Richtung des Sublakunarsystems ziehen, jedoch keine direkte Verbindung herstellen (Abbildung 36F). Im Kanalsystemabguss des adulten Exemplares von *T. wilhelma* hingegen konnten eindeutig Verbindungen des Lakunennetzwerkes mit dem Sublakunarsystem nachgewiesen werden (Abbildung 36B). Auf der dem Substrat zugewandten Seite des



**Abbildung 36:** 3D-Renderings von virtuellen Kanalsystemabgüssen eines juvenilen (A, C, E, F) und eines adulten (B, D) Exemplars von *T. wilhelma*. (A) Anschnitt, der Lakunen (lak) im Cortex, Teile des Sublakunarsystems (sls) und des Kanalnetzwerkes im Choanosom zeigt. (B) Anschnitt, der Lakunen (lak) im Cortex mit Verbindungen zum Sublakunarsystem (sls) und das Kanalnetzwerk im Choanosom zeigt. Verbindungen zwischen Lakunen und Sublakunarsystem sind durch Pfeile gekennzeichnet. (C) Netzwerk von Lakunen in einem Jungschwamm. (D) Großflächige Lakunen eines adulten *T. wilhelma* Exemplars. (E) Detail des Lakunennetzwerks eines Jungschwammes mit Ostiafeldern (ost). (F) Segmentierter Teil des Sublakunarsystems (sls, orange) unterhalb der Lakunen im Cortex. Vom Osculum (osc, grün) zieht ein großer Kanal in das Choanosom.





**Abbildung 37:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (A, C) und 3D-Renderings (B, D, F) eines Kanalsystemabgusses, die Lakunen (lak), Osculum (osc) und weit verzweigte Kanäle des einführenden und ausführenden Kanalsystems zeigen. Ein Kanal der durch Verbindung der Lakunen mit dem Osculum eine Bypassstruktur (byp) bildet, stellt eine direkte Verbindung von einführendem und ausführendem Wasserleitungssystem dar. Überschüssiges Harz, das bei der Injektion wieder aus dem Schwamm austrat, ist in den Aufnahmen gelb markiert (A, C) und wurde in den 3D-Rekonstruktionen entfernt. (B, D) Die 3D-Renderings des Kanalsystemabgusses entsprechen den Ansichten der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in (A) und (C). (E) Bypassstruktur (byp), die eine direkte Verbindung des einführenden Kanalsystems, ausgehend von einer Lakune, mit dem ausführenden Kanalsystem herstellt. (F) Unterteilung des Kanalsystems in Bereiche die von einzelnen größeren Kanälen versorgt werden.

Schwammes sind die Lakunen des Cortex und des Sublakunarsystems stark abgeflacht ausgebildet. Im Choanosom findet sich ein dichtes Netzwerk aus einführenden und ausführenden Kanälen. Im Vergleich zum Kanalnetzwerk des Jungschwammes finden sich hier einzelne Kanäle mit extrem großem Durchmesser (Abbildung 36B). Die Lakunen im Cortex sind im Vergleich zu den Lakunen des Jungschwammes größer ausgebildet und bedecken fast die gesamte Fläche des Cortex. Aufgrund der niedrigeren Auflösung des Mikrotomografiedatensatzes im Vergleich zum Datensatz des Jungschwammes konnten hier keine Ostienfelder identifiziert werden.

Der Kanalsystemabguss eines adulten Exemplares von *T. wilhelma* der durch injizieren eines Kunstharzes in das Osculum gewonnen wurde, zeigt überwiegend Teile des ausführenden Kanalsystems (Abbildung 37). Zwei große Kanäle die in ein gemeinsames Osculum münden sind eindeutig zu identifizieren (Abbildung 37A, C, E). Das Kunstharz ist bis in fein verzweigte Kanalbereiche eingedrungen, die bis auf die Ebene von Choanozytenkammern reichen. An den Enden der fein verzweigten Kanäle zeigen sich kugelförmige Erhebungen, die Apopylen, den Verbindungen der Choanozytenkammern zum ausführenden Kanalsystem; zugeordnet wurden. Teilweise wurden Bereiche des einführenden Kanalsystems durch das Kunstharz ausgefüllt. Deutlich ist eine Lakune zu identifizieren, bei der ein Teil des injizierten Kunstharzes über Ostienfelder wieder aus dem Schwamm ausgetreten ist (Abbildung 37C-D). Von der Lakune zweigen kleinere Kanäle ab, die sich weiter verzweigen und ebenfalls, wie die fein verzweigten Kanäle des ausführenden Wasserleitungssystems, blind enden. Hier konnte das Harz ebenfalls nicht über die Prosopyle in die Choanozytenkammern eindringen. Ausgehend von der Lakune erstreckt sich ein größerer Kanal, der direkt mit den großen ausführenden Kanälen die in das Osculum münden, in Verbindung steht (Abbildung 37C-E). Auf diese Weise bildet sich eine Bypassstruktur die einen Wasserfluss aus dem einführenden zum ausführenden Wasserleitungssystem ermöglicht, ohne die Choanozytenkammern zu passieren.

Anhand einer 3D Rekonstruktion des Kanalsystemabgusses wurde dieser in Subvolumen unterteilt, die die Einzugsbereiche größerer Kanäle darstellen. Es ergaben sich insgesamt 8 Bereiche die durch die Anbindung über einen größeren Kanal Regionen des Schwammes mit Wasser versorgen oder entwässern (Abbildung 37F). Unter Anwendung eines Skeletonisierungsalgorithmus wurde der rekonstruierte 3D-Datensatz des Kanalsystemabgusses auf eine 1 Voxel dicke Mittelliniendarstellung reduziert. Das so erhaltene Gerüst wird durch eine Linie repräsentiert die sich genau im Zentrum der ursprünglichen Kanäle befindet und somit die Topologie des Kanalsystems in einer vereinfachten Form wiedergibt (Abbildung 38C). Diese Mittellinie wurde zur Bestimmung unterschiedlicher morphometrischer Parameter genutzt. Hierzu zählten die Kanaldurchmesser an den Endpunkten von Kanälen, an Verzweigungspunkten, kurz hinter Verzweigungspunkten, die Länge einzelner Kanalabschnitte, der Abstand terminaler Kanäle und die Verzweigungswinkel von Kanälen. Die Messungen ergaben Kanaldurchmesser von 15  $\mu\text{m}$  bis 235  $\mu\text{m}$ . Im Durchschnitt wiesen die Kanäle einen Durchmesser von 63  $\mu\text{m}$  bis 64  $\mu\text{m}$  auf (Abbildung 38A-B). Die Länge der einzelnen Kanalabschnitte betrug im Mittel 77  $\mu\text{m}$  (Abbildung 38C). Jedoch konnten auch sehr lange Kanalabschnitte bis 600  $\mu\text{m}$  beobachtet werden. Kurze Kanalabschnitte die minimal 7,5  $\mu\text{m}$  betrugen wurden überwiegend an terminalen Kanälen bestimmt. Die Bestimmung der Verzweigungswinkel ergab im Mittel einen Wert von 93° (Abbildung 38D). Es konnten jedoch auch sehr flache, bzw. spitze Winkel beobachtet werden die von 17° bis 167° reichten. Der Abstand zwischen den Mittellinien terminaler Kanäle betrug durchschnittlich 82  $\mu\text{m}$  (Abbildung 38E).

Für einen Teil des Datensatzes, dunkelgrün markiert in Abbildung 37F, wurde eine Klassifizierung der Kanalabschnitte in unterschiedliche Hierarchieebenen erstellt. Die Analyse erfolgte mit zwei unterschiedlichen Ansätzen, die beide eine Klassifizierung nach der Horton-Strahler Methode verwendeten. In der Software *CoralSoft* wurde das mit Hilfe eines Skeletonisierungsalgorithmus berechnete Gerüst des Wasserleitungssystems, welches in den 3D-Renderings als Mittelliniendarstellung gezeigt ist, weiter vereinfacht. Stark gewinkelte Abschnitte wurden geglättet, und kurze endständige Abschnitte ( $< 5 \mu\text{m}$ ), die bei der Berechnung durch Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche entstehen, entfernt. Ferner wurden im Datensatz enthaltene Ringstrukturen manuell getrennt. Als Startpunkt für die Einteilung der Hierarchieebenen der Kanalabschnitte diente das Ende des großen Kanals, mit dem alle weiteren Kanäle des Subvolumens in Verbindung stehen. Die klassifizierten Kanalsystemabschnitte sind im 3D-Modell in Abbildung 39A den unterschiedlichen Hierarchieebenen entsprechend farblich markiert. Die Analyse ergab sechs Hierarchiestufen, wobei der letzte Messwert für die Klasse 6 auf demselben Ast des berechneten Gerüsts zu finden ist, und ebenfalls der 5. Hierarchiestufe zuzurechnen ist. Dieser entspricht dem Abschnitt der als Startpunkt für die Analysen gewählt wurde. Die Anzahl der Kanäle nimmt von der ersten zur fünften Hierarchieebene hin ab. Kanäle der ersten Hierarchiestufen, die sich an den Enden der Verzweigungen finden, wiesen im Mittel einen Durchmesser von  $27 \mu\text{m}$  auf, und stellen zusammen mit den Kanälen der zweiten Hierarchiestufe, die durchschnittlich einen Kanaldurchmesser von  $38 \mu\text{m}$  aufwiesen, den größten Teil der bestimmten Messwerte dar (Abbildung 39C, E, Tabelle 2). Die Kanäle der dritten, vierten und fünften Hierarchiestufen wiesen im Mittel Durchmesser von  $49 \mu\text{m}$ ,  $55 \mu\text{m}$  und  $83 \mu\text{m}$  auf (Tabelle 2). Eine Klassifizierung der Kanäle anhand des Durchmessers war nicht möglich, da die Größenklassen von Kanälen der verschiedenen Hierarchiestufen teilweise stark überlappen (Abbildung 39E). Zwischen den unterschiedlichen Hierarchiestufen konnten Skalierungsfaktoren für die Zunahme der Kanaldurchmesser zwischen 1,1 und 1,5 bestimmt werden (Tabelle 2).

Mit dem selben Datensatz wurde eine Klassifizierung der Kanaldurchmesser nach der Horton-Strahler Methode manuell unter Verwendung des *Excel* Plugin *NodeXL* durchgeführt. Das Gerüst des Kanalsystemabgusses, welches als Grundlage für die Analysen diente, wurde in *MevisLab* mit einem Distance-Transform-Algorithmus berechnet. Im Datensatz vorhandene Ringstrukturen wurden nur aufgebrochen, wenn sie eindeutig als Artefakt des Skeletonisierungsalgorithmus identifiziert werden konnte. Kurze, endständige Abschnitte ( $< 5 \mu\text{m}$ ), die bei der Berechnung durch Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche entstanden, wurden manuell entfernt. Kanalabschnitte, die an der Ausbildung von Ringstrukturen beteiligt sind, wurden bei der Klassifizierung der Hierarchiestufen jeweils derselben Kategorie zugeordnet. Als Startpunkt für die Klassifizierung wurde der selbe Kanalabschnitt wie in der vorhergehenden Analyse verwendet. Die Einteilung der Kanalabschnitte ergab insgesamt sechs unterschiedliche Kategorien, die in Abbildung 39E, den Hierarchiestufen entsprechend eingefärbt, dargestellt sind. Für die Größenklassen der bestimmten Kanaldurchmesser der einzelnen Hierarchiestufen ergab sich eine feinere Abstufung, die besonders in den ersten

Nächste Seite ►►►

---

**Abbildung 38:** Histogramme der Messungen von Kanaldurchmessern an Verzweigungspunkten und an den Spitzen von terminalen Kanälen (A), Kanaldurchmesser nach Verzweigungspunkten (B), Länge der Kanäle (C), Verzweigungswinkel von Kanälen (D) und Abstand benachbarter terminaler Kanäle (E). Zu den Histogrammen sind jeweils entsprechend Renderings der Mittelliniendarstellung des Kanalsystemabgusses dargestellt, die die eingepassten Sphären zur Bestimmung der Kanaldurchmesser (A, B) und des Abstandes terminaler Kanäle (E) zeigen, sowie für die Bestimmung der Länge von Kanälen und der Verzweigungswinkel genutzt wurden.

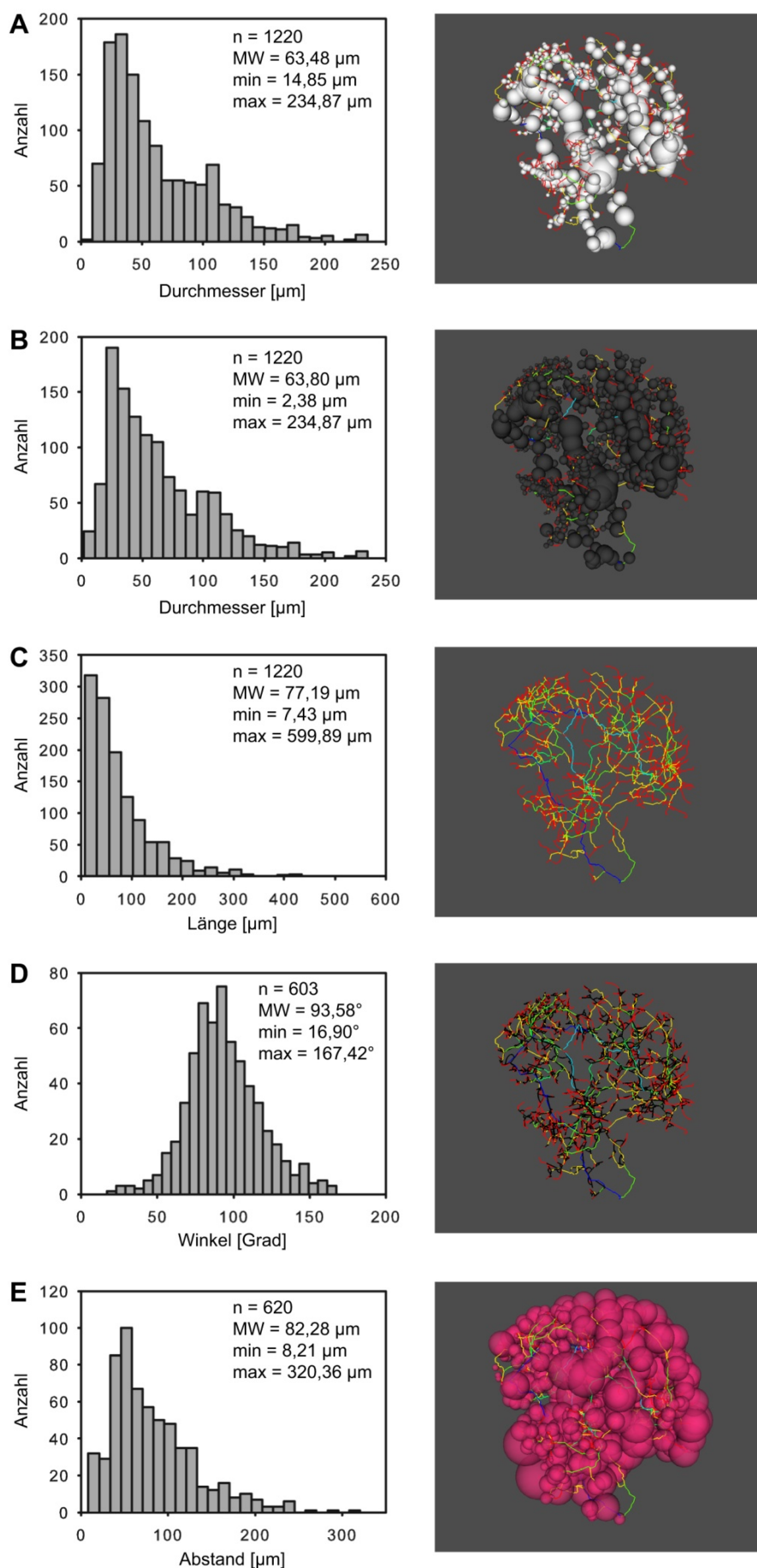
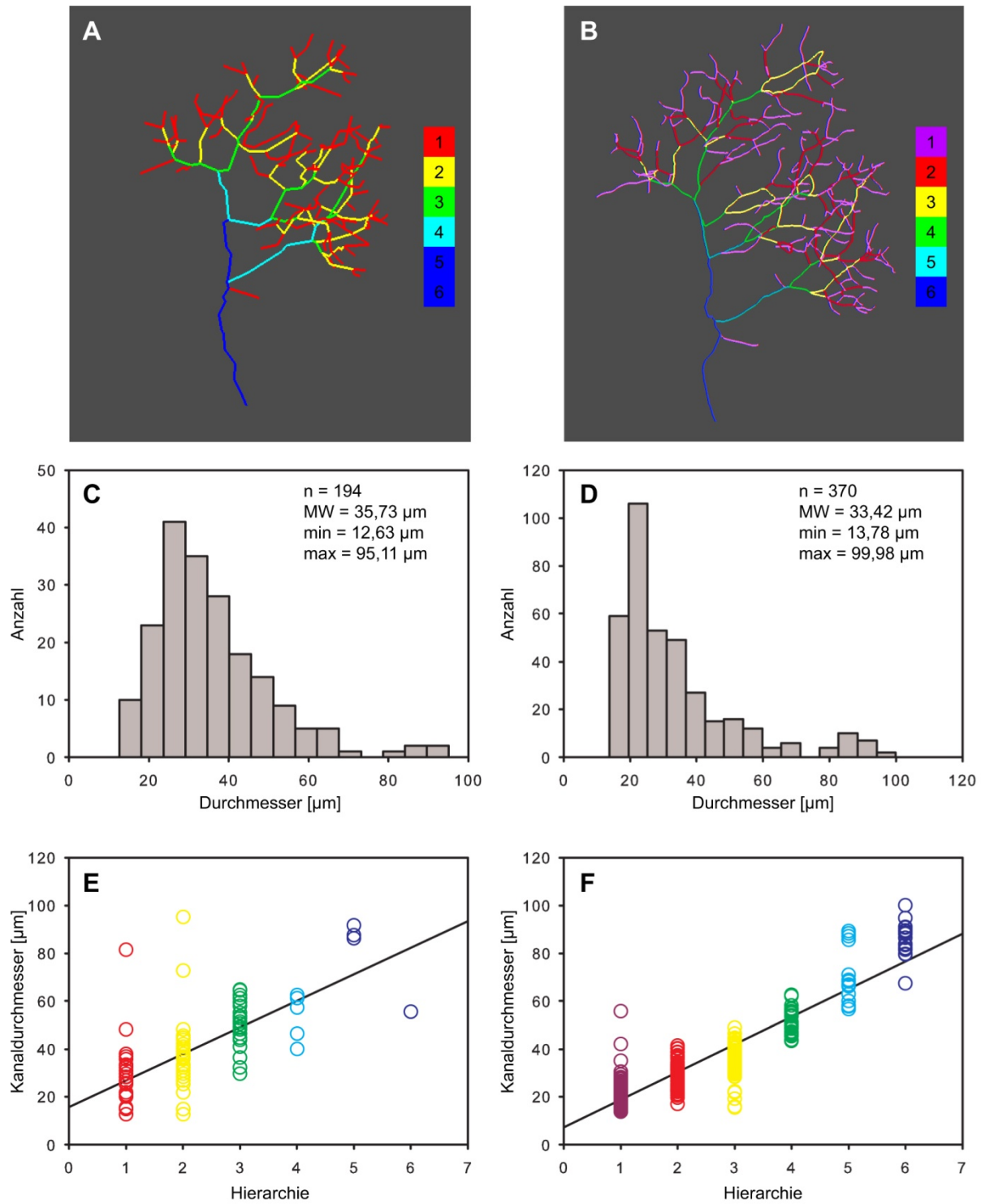


Abbildung 38: Legende siehe vorhergehende Seite.





**Abbildung 39:** Vergleich der Ergebnisse zur Bestimmung der Kanaldurchmesser und Verzweigungshierarchien von Kanälen von einem Teil des Kanalsystemabgusses (Datensatz K, Tabelle 1). Linke Spalte Ergebnisse aus der Software *CoralSoft*, rechte Spalte Ergebnisse aus der Software *MevisLab* und *NodeXL*. (A, B) Mittelliniendarstellung des Kanalsystems, eingefärbt in Abhängigkeit der Verzweigungshierarchie der einzelnen Kanäle bestimmt nach der Horton-Strahler-Klassifizierung (vgl. Abbildung 13). (C, D) Histogramm der ermittelten Kanaldurchmesser. (E, F) Plot der Kanaldurchmesser in Abhängigkeit der Hierarchieebene mit Regressionsgeraden.

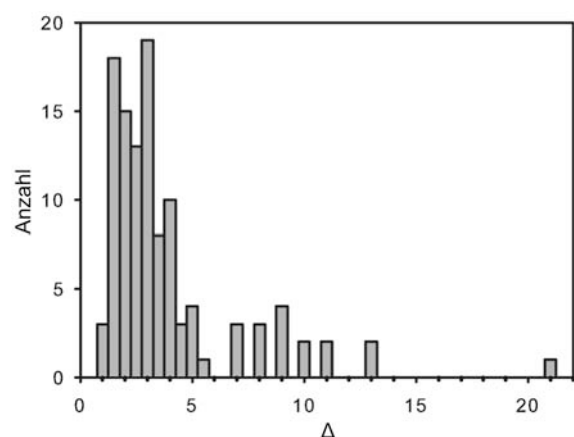
drei Hierarchiestufen deutlich zu erkennen ist (Tabelle 2). Die ersten drei Größenklassen mit durchschnittlichen Kanaldurchmessern von 21  $\mu\text{m}$ , 29  $\mu\text{m}$  und 35  $\mu\text{m}$  umfassen damit ungefähr den Bereich der in der vorhergehenden Analyse durch die ersten beiden Hierarchieebenen abgedeckt wurde (Tabelle 2, Abbildung 39F). Mit Kanaldurchmessern von 70  $\mu\text{m}$  ordnet sich die fünfte Hierarchiestufe zwischen der vierten und fünften Hierarchiestufe der vorhergehenden Analyse ein (Tabelle 2). Die Kanäle der ersten vier Hierarchieebenen stellen zusammen den größten Anteil der Kanäle im untersuchten System (Abbildung 39D). Eine Klassifizierung der Hierarchieebenen anhand der Größenklassen war nicht möglich, da die Durchmesser der Kanäle der unterschiedlichen Hierarchiestufen stark überlappen (Abbildung 39F). Zwischen Kanälen der verschiedenen Hierarchieebenen ergaben sich Skalierungsfaktoren zwischen 1,2 und 1,5 für die Kanaldurchmesser.

Um den Zusammenhang zwischen Kanaldurchmessern und Verzweigungsgeometrien zu untersuchen wurde der Parameter  $\Delta$  (Mandelbrot 1983) näherungsweise bestimmt. Die berechneten Werte lagen zwischen 1 und 21, wobei 85 % der Werte auf das Intervall zwischen 1 und 5,5 entfallen (Abbildung 40). Die hohe Variabilität der Werte weist auf sich nicht regulär verzweigende Bereiche des Kanalsystems hin. Beispielsweise T-förmige Verzweigungen bei der es zu keiner Reduktion der Kanaldurchmesser hinter dem Verzweigungspunkt kommt. Werte aus sich regelmäßig verzweigenden Bereichen des Kanalsystems finden sich im Intervall von 1 bis 6. Besonders häufig waren Werte im Intervall von 1 bis 1,5 und von 2,5 bis 3 vorzufinden (Abbildung 40). Berücksichtigt man nur die Werte aus sich regelmäßig verzweigenden Bereichen des Kanalsystems (Intervall von 1 bis 6) ergibt sich für  $\Delta$  im Mittel ein Wert von 3.

Die Kanaldurchmesser von vollständigen Kanalsystemabgüssen zweier adulter und eines juvenilen Exemplares von *T. wilhelma* wurden miteinander verglichen (Abbildung 41). In den Analysen wurden nur Kanäle mit einem Durchmesser größer 10,5  $\mu\text{m}$  berücksichtigt, um die feinen vom Segmentierungs-Algorithmus als Kanäle erkannten Bereiche, die durch Hohlräume im Mesohyl entstehen, auszuschließen. In den beiden adulten Exemplaren konnten Kanäle mit Durchmessern zwischen 10,5  $\mu\text{m}$  und 311  $\mu\text{m}$  bzw 219  $\mu\text{m}$  vorgefunden werden (Abbildung 41B-C). Im Exemplar, an dem die Messungen an einem virtuellen Kanalsystemabguss vorgenommen wurden, betrug der durchschnittliche Kanaldurchmesser

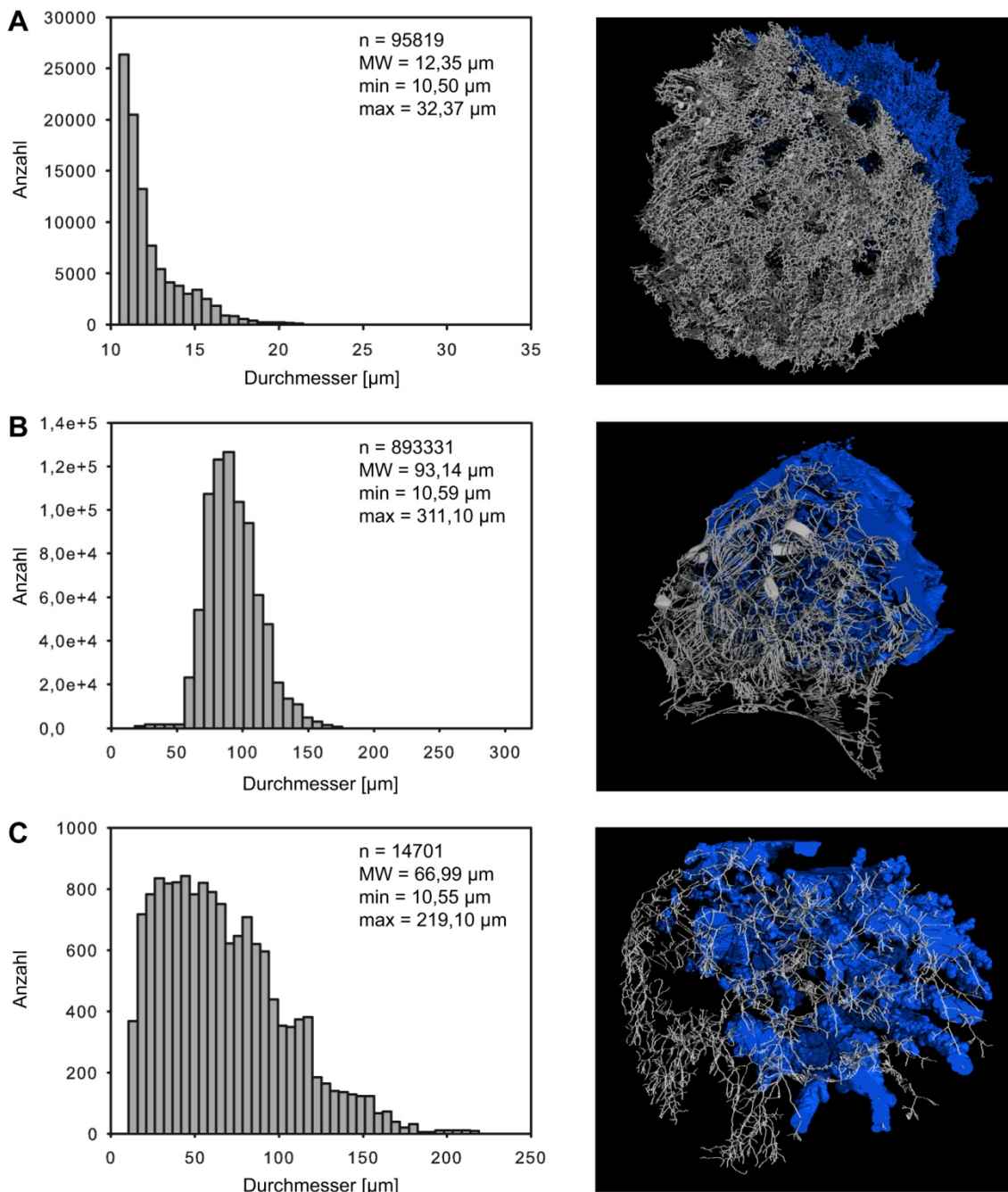
**Tabelle 2: Mittelwerte (MW) und Skalierungsfaktoren (Sf) der Kanaldurchmesser für ein Subvolumen (dunkelgrün in Abbildung 36F) des Datensatzes K (vgl. Abbildung 39).**

Klasse	CoralSoft		MevisLab	
	MW [ $\mu\text{m}$ ]	Sf	MW [ $\mu\text{m}$ ]	Sf
1	26,77		21,13	
2	37,68	1,41	29,08	1,38
3	49,36	1,31	34,91	1,20
4	54,98	1,11	50,89	1,46
5	83,19	1,51	70,45	1,38
6			85,90	1,22



**Abbildung 40:** Histogramm der Skalierungsparameter  $\Delta$  an Verzweigungspunkten von Kanälen, die für ein Subvolumen des Datensatzes K, bestimmt wurden (vgl. Abbildung 39). Details siehe Text.





**Abbildung 41:** Histogramme der Kanaldurchmesser und entsprechende 3D-Renderings der Kanalsystemabgüsse, die jeweils zur Hälfte das Kanalsystem in der Mittelliniendarstellung zeigen. (A) Virtueller Kanalsystemabguss eines Jungschwammes. Kanaldurchmesser wurden nur für den halben Datensatz, wie in der Mittelliniendarstellung gezeigt, berechnet. (B) Virtueller Kanalsystemabguss eines adulten Exemplares von *T. wilhelma*. (C) Kanalsystemabguss eines adulten Exemplares von *T. wilhelma*.

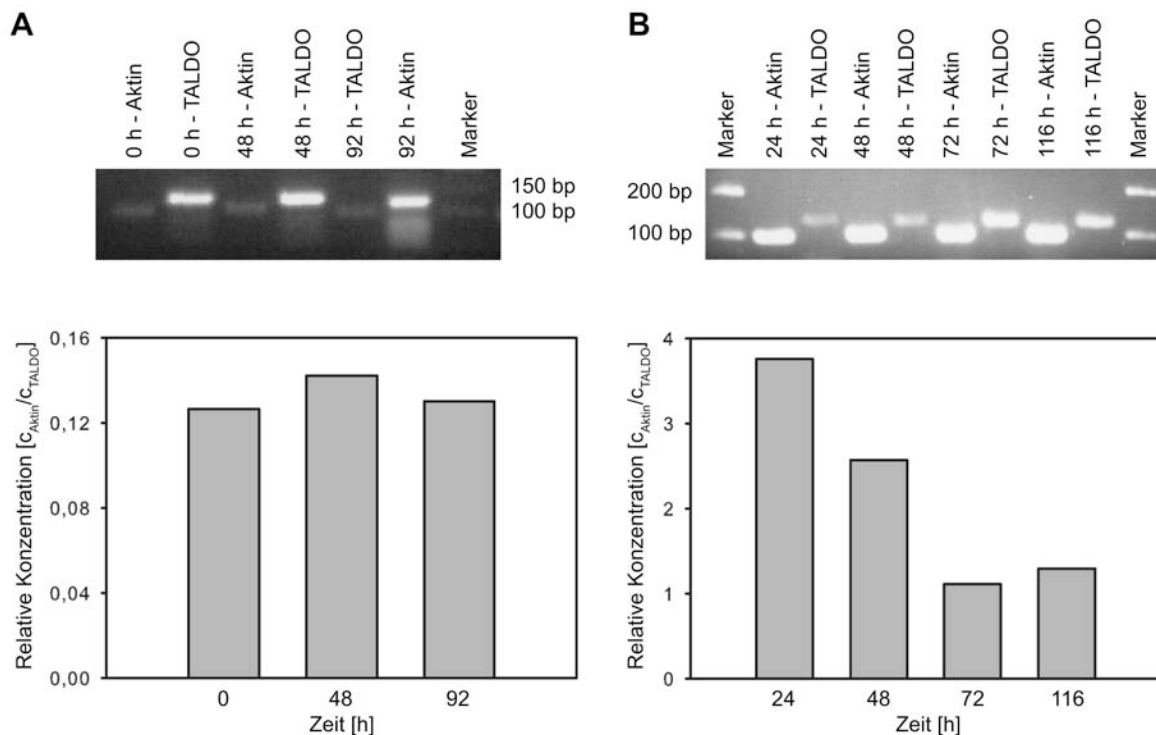
93  $\mu\text{m}$  (Abbildung 41B). Der virtuelle Kanalsystemabguss enthielt auch die großflächigen Lakunen des einführenden Kanalsystems (Abbildung 36B, D). Der andere Kanalsystemabguss eines adulten Individuums enthielt große Teile des ausführenden Wasserleitungssystems, und nur kleinere Bereiche des einführenden Kanalsystems mit wenigen Lakunenbereichen (Abbildung 37). Hier lag der Kanaldurchmesser im Mittel bei 67  $\mu\text{m}$  (Abbildung 41C). Im virtuellen Kanalsystemabguss des juvenilen Exemplars, der sowohl einführendes wie auch ausführendes Wasserleitungssystem enthielt (vgl. Abbildung 36A, C), betrug der Durchmesser der größten Kanäle 32  $\mu\text{m}$ . Die Kanäle wiesen im Mittel einen Durchmesser von 12  $\mu\text{m}$  auf (Abbildung 41A).

### 4.3 Fütterungsinduzierte RNA-Interferenz in *Tethya wilhelma*

#### 4.3.1 Bestimmung des Fütterungsintervalles zur Aufnahme von dsRNA

Die Aktin-mRNA-Level von *T. wilhelma* Knospen aus Experimenten zur Genexpressionskontrolle wurden anhand der Konzentration von PCR-Fragmenten in Agarose-Gelen semi-quantitativ bestimmt. Die Quantifizierung der Aktin-mRNA-Level erfolgte relativ zu einem endogenen Referenzgen, der Transaldolase aus dem Pentosephosphatweg (TALDO). Für die PCR wurden zwischen 120 ng/μl und 500 ng/μl cDNA eingesetzt, die durch reverse Transkription aus isolierter Gesamt-RNA von *T. wilhelma* Knospen gewonnen wurde. Mittels dieser Quantifizierungen sollte sowohl die Methode der Genexpressionskontrolle anhand von dsRNA-exprimierenden Bakterien getestet, wie auch das Fütterungsintervall für die Aufnahme einer kritischen Menge von dsRNA bestimmt werden, die nötig ist, um eine Erniedrigung der Aktin-mRNA-Level zu erreichen.

Knospen, die für 20 min in einer Lösung mit dsRNA-exprimierenden Bakterien inkubiert wurden, zeigten nach 48 h ein leicht erhöhtes und nach 92 h ein, im Vergleich zur Kontrollgruppe, unverändertes Aktin-mRNA-Level (Abbildung 42A). Somit konnte im Inkubationszeitraum von 20 min nicht die für eine Erniedrigung der Aktin-mRNA-Level kritische Menge an dsRNA in die Zellen aufgenommen werden. Die leichte Erhöhung nach 48 h ist auf die Variabilität zwischen einzelnen Individuen zurückzuführen oder deutet auf eine nicht konstante Expression des Referenzgens hin.



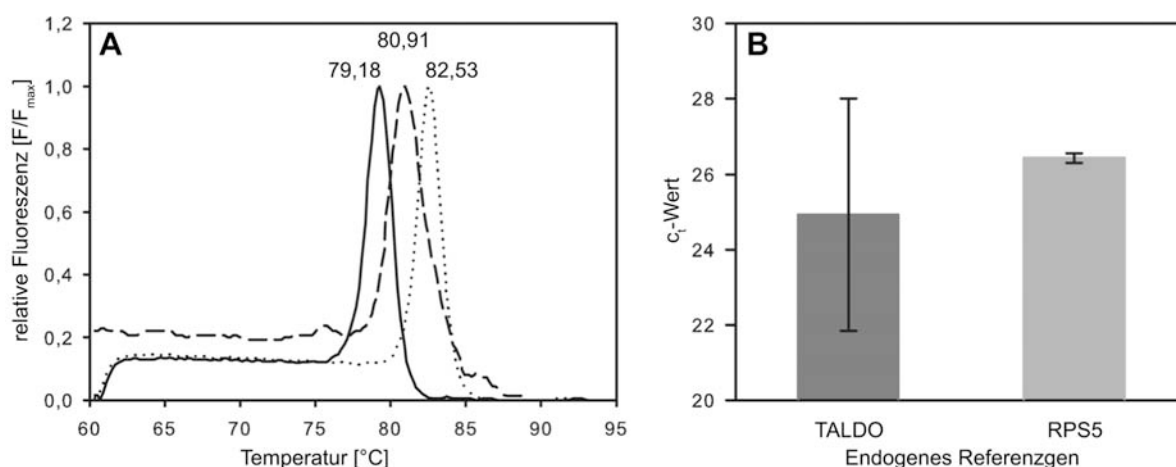
**Abbildung 42:** Semi-quantitative Bestimmung der Aktin-mRNA-Level anhand von Agarose Gelen (obere Reihe) mit PCR-Produkten ausgehend von cDNA von *T. wilhelma*-Knospen. Die Konzentration der Aktin-Fragmente wurde auf die Konzentration des endogenen Referenzgens (TALDO) normalisiert und über den Kultivierungszeitraum aufgetragen (untere Reihe). (A) Ergebnisse aus einem Experiment nach Fütterung mit dsRNA-exprimierenden HT115(DE3)/L4440-Act6 Bakterien für 20 min und anschließender Kultivierung der Knospen über 92 h. (B) Ergebnisse aus einem Experiment nach Fütterung mit dsRNA-exprimierenden HT115(DE3)/L4440-Act6 Bakterien für 24 h und anschließender Kultivierung der Knospen für 116 h.

Knospen, die für 24 h in einer Lösung mit dsRNA-exprimierenden Bakterien inkubiert wurden, zeigen hingegen eine Erniedrigung der Aktin-mRNA-Level. Nach 48 h konnte, im Vergleich zur Konzentration nach 24 h, ein um 32 % erniedrigtes Aktin-mRNA-Level bestimmt werden. Nach 72 h zeigte sich eine Erniedrigung um 70 % und nach 116 h eine Erniedrigung um 66 % (Abbildung 42B).

#### 4.3.2 Evaluierung der Primer und des endogenen Referenzgens

Da für *T. wilhelma* noch keine Informationen hinsichtlich des gesamten Genoms bzw. Transkriptoms verfügbar sind, die anhand einer bioinformatischen Analyse die Evaluierung der gewählten Primer ermöglichen würden, wurden die Primer für das Aktin-, TALDO- und RPS5-Fragment mittels Schmelzkurvenanalyse nach einer qRT-PCR getestet, um sicherzustellen, dass nur das gewünschte Fragment amplifiziert wird. Die Kurvenverläufe der zweiten Ableitung der detektierten Fluoreszenzabnahme im Verlauf der Schmelzkurvenanalyse zeigen für die jeweiligen Fragmente ein Maximum und keine Nebenmaxima (Abbildung 43A). Damit kann eine unerwünschte Bindung der Primer an andere cDNA Sequenzen ausgeschlossen werden. Die bestimmten Schmelztemperaturen von 79,18 °C für Aktin, 80,91 °C für RPS5 und 82,53 °C für TALDO stimmen annähernd mit den berechneten Werten von 78 °C für Aktin, 80 °C für RPS5 und 82 °C für TALDO überein. Die Abweichungen sind auf die nicht genau bekannten Salzkonzentrationen im Reaktionsgemisch der Firma PeqLab zurückzuführen. Für die Berechnungen wurde eine Gesamtkonzentration von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  von 50 mM und  $\text{Mg}^{2+}$  von 1,5 mM angenommen.

Mittels qRT-PCR wurde die Stabilität der Expression des endogenen Referenzgens anhand der gemessenen  $C_t$ -Werte bestimmt. Diese sind ein Anhaltspunkt für die mRNA-Level des bestimmten Gens und sollten nur geringfügig schwanken, wenn dieselbe Menge an cDNA als Template eingesetzt wird. Im Falle der Transaldolase aus dem Pentosephosphatweg (TALDO), die als endogenes Referenzgen ausgewählt worden war, zeigten sich im Vergleich mehrerer qRT-PCR Läufe stark schwankende  $C_t$ -Werte. Diese wichen um rund drei Einheiten vom Mittelwert 24,9 mehrerer Läufe ab (Abbildung 43B). Daher wurde die Transaldolase als endogenes Referenzgen für weitere Versuche verworfen und stattdessen ein Protein des S5 Clusters der 40S ribosomalen Untereinheit (RPS5) als endogenes

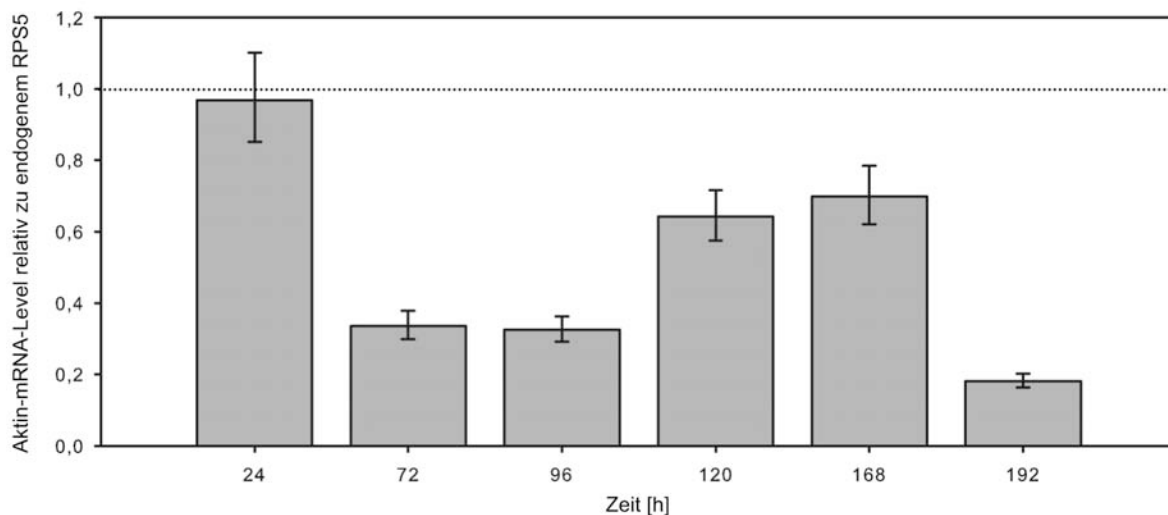


**Abbildung 43:** (A) Schmelzkurven von Aktin- (durchgezogene Linie), RPS5- (gestrichelte Linie) und TALDO- (gepunktete Linie) PCR-Fragmenten, detektiert mit Cyber-Green nach einer qRT-PCR. (B)  $C_t$ -Werte der endogenen Referenzgene TALDO und RPS5.

Referenzgen ausgewählt. Dieses zeigte einen  $C_T$ -Mittelwert von 26,4 und nur sehr geringe Abweichungen in unterschiedlichen Läufen von 0,1 Einheiten (Abbildung 43B). Aufgrund der stabilen Expression wurde RPS5 als endogenes Referenzgen für die relative Quantifizierung der Aktin-mRNA-Level in qRT-PCR Analysen in den weiteren Experimenten eingesetzt.

#### 4.3.3 Regulation der Aktin-Expression in *Tethya wilhelma*

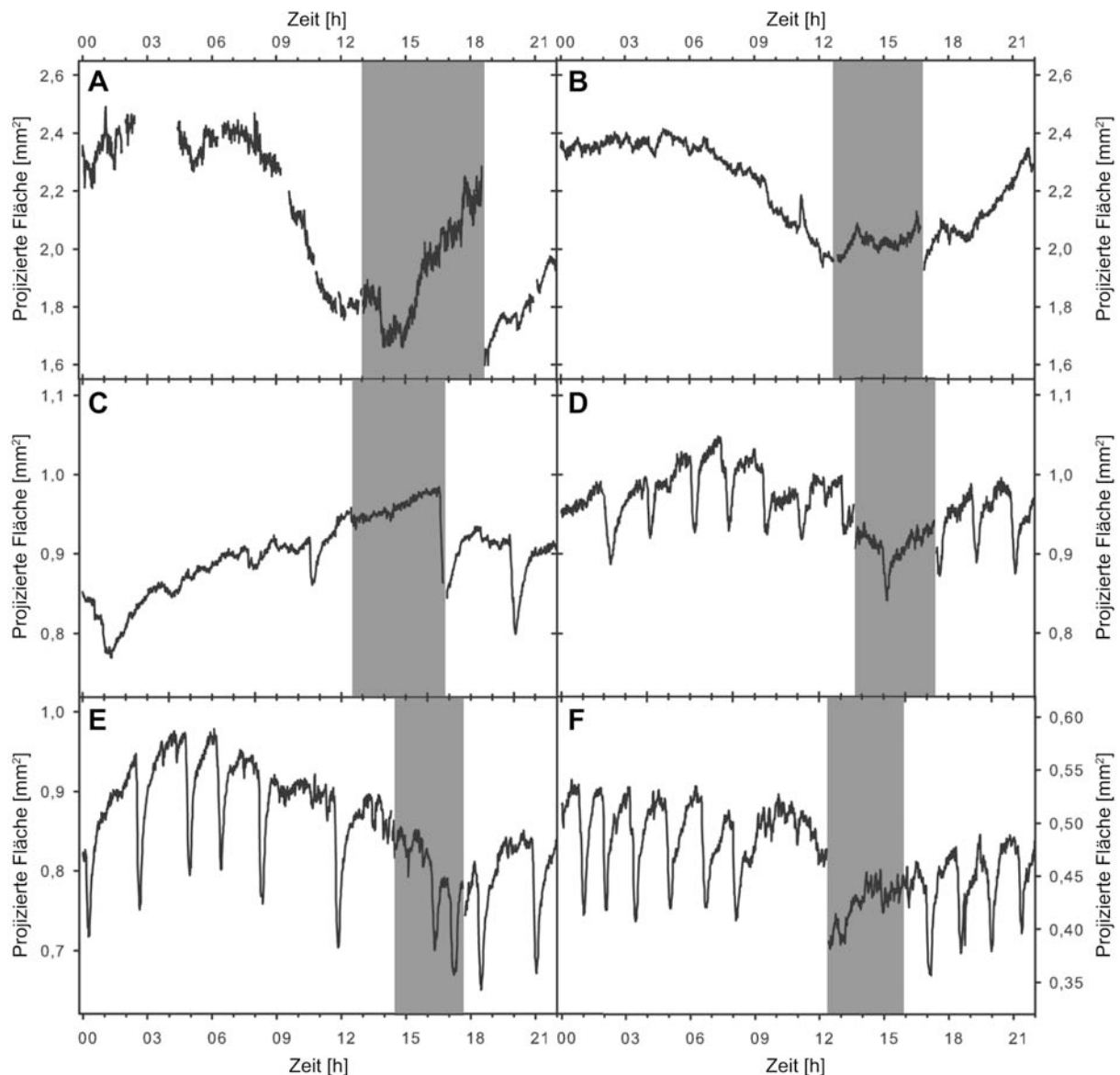
Ein neu entwickeltes Protokoll zur Genexpressionskontrolle in Schwämmen (vgl. Abschnitt 3.6.5) wurde anhand der Manipulation der Aktin-mRNA-Level in *T. wilhelma* getestet. Knospen von *T. wilhelma* wurden hierfür täglich 4,5 h in einer Lösung mit Bakterien, die dsRNA eines 703 bp langen Fragments des *T. wilhelma* Aktin-Gens exprimieren, inkubiert. Zur Bestimmung der Aktin-mRNA-Level der Knospen wurde die Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA transkribiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR durch Amplifikation eines 92 bp langen Aktin- und eines 61 bp langen RPS5-Fragmentes, welches als endogenes Referenzgen für die relative Quantifizierung diente. Die Analyse erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode und zeigt die Aktin-mRNA-Level als Vielfache im Vergleich einer dsRNA behandelten zu einer unbehandelten Knospe. Nach 24 h zeigte sich keine signifikante Veränderung der Aktin-mRNA-Level. Nach 72 h jedoch konnte eine Reduktion auf rund 33 % des Ausgangsniveaus nachgewiesen werden, die auch nach 96 h (32 %) bestehen blieb. Im weiteren Verlauf des Experimentes stieg das Aktin-mRNA-Level nach 120 h wieder auf 64 % und nach 168 h auf 69 % an. Nach 192 h erreichten die Aktin-mRNA-Level ein Minimum bei rund 18 %. Dies stellt eine signifikante Erniedrigung der Aktin-mRNA-Level durch Fütterung von dsRNA-exprimierenden Bakterien in *T. wilhelma* Knospen dar. Für die Proben, die nach 48 h und nach 148 h entnommen wurden, konnten keine relativen Aktin-mRNA-Level bestimmt werden, da keine eindeutigen PCR-Fragmente amplifiziert wurden.



**Abbildung 44:** Aktin-mRNA-Level in *T. wilhelma* Knospen nach täglicher Fütterung mit dsRNA-exprimierenden HT115(DE3)/L4440-Act6 Bakterien für 4,5 h und Kultivierung über einen Zeitraum von 192 h. Die Aktin-mRNA-Level sind relativ zum endogenen RPS5 dargestellt (gestrichelte Linie) und wurden mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode bestimmt.

#### 4.3.4 Phänotypen von Aktin-inhibierten *Tethya wilhelma*-Jungschwämmen

In den Experimenten zur Genexpressionskontrolle von Aktin wurden die eingesetzten Jungschwämme hinsichtlich äußerlich erkennbarer Phänotypen untersucht. Da es sich bei Aktin um ein Housekeeping-Gen handelt, das in allen Zellen stark exprimiert wird, wurden deutlich erkennbare Phänotypen erwartet. Aufgrund der zentralen Rolle von Aktin beim Aufbau des Zytoskeletts, der Funktion als Ankerprotein für Transmembranproteine und der Beteiligung am Kurzstreckentransport von Vesikeln zur Membran entlang des Aktinnetzes wurde bei einer stark veränderten Aktin-Expression ein letaler Phänotyp erwartet. Dieser konnte nicht beobachtet werden. Keiner der Jungschwämme in den Experimenten zeigte veränderte Überlebensraten über den Zeitraum des Experimentes. In Eukaryoten spielt Aktin



**Abbildung 45:** Projizierte Fläche von Knospen im Verlauf eines Experimentes zur Genexpressionskontrolle. Gezeigt sind jeweils die letzten 22 h vor der Fixierung der Knospen für die Extraktion von Gesamt-RNA. Grau unterlegt sind die Zeiträume der Fütterung der Knospen mit dsRNA-exprimierenden HT115(DE3)/L4440-Act6 Bakterien. Am Ende des Fütterungszeitraumes fand jeweils ein Wasserwechsel statt. Die projizierten Flächen zeigen, sofern vorhanden, Körperkontraktionen der Knospen. Der Kultivierungszeitraum der Knospen vor der Fixierung betrug (A) 24 h, (B) 72, (C) 96 h, (D) 120 h, (E) 168 h und (F) 192 h.

ebenfalls eine wichtige Rolle in unterschiedlichen Kontraktionsvorgängen und bei Zellbewegungen. Daher wurde für *T. wilhelma* ein Phänotyp, der veränderte oder ausbleibende Körperkontraktionen (vgl. Abschnitt 4.1.5) postuliert, angenommen. Die makroskopisch sichtbaren Körperkontraktionen von *T. wilhelma* wurden hinsichtlich einer veränderten Dynamik und Rhythmik untersucht. Der Einfluss von veränderten Aktin-mRNA-Leveln auf Körperkontraktionen wurde über den Zeitraum des Experimentes anhand von Zeittrafferaufnahmen der Knospen verfolgt. Um Veränderungen der Körperkontraktionen zu bestimmen, wurde in den aufgenommenen Bildsequenzen die projizierte Fläche der Knospen ermittelt und über der Zeit aufgetragen (Abbildung 45).

Im Verlauf der ersten 48 h des Experimentes gefilmte Knospen zeigten keine Körperkontraktionen (Abbildung 45A-B). Die im Zeitraum bis 72 h beobachtete Knospe zeigte wenige, unregelmäßige Körperkontraktionen, die sich in der Dynamik aber nicht von regulären Körperkontraktionen unterschieden (Abbildung 45C). Unveränderte und regelmäßige Kontraktionen zeigten die im Zeitraum von 120 h bis 192 h beobachteten Knospen (Abbildung 45D-F).

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die Anwendung der fütterungsinduzierten RNA-Interferenz für funktionelle Untersuchungen an genregulatorischen Netzwerken in Schwämmen gezeigt und etabliert werden. Hierfür waren eine Reihe von morphologischen Voruntersuchungen notwendig, die wichtige Lücken in der Kenntnis der Biologie des Demospongien *T. wilhelma* schlossen. Um die in dieser Art in großer Zahl verfügbaren Knospen (agametische asexuelle Vermehrungsstadien) für funktionelle genomische Untersuchungen nutzbar zu machen, wurde deren Entwicklung detailliert untersucht und charakteristische Entwicklungsstadien beschrieben. Die gebildeten Jungschwämme wurden auf ihre Funktionalität hin überprüft. Dies beinhaltet neben der Fähigkeit der Aufnahme von Nahrungspartikeln auch die Identifizierung des frühesten funktionalen Wasserleitungssystems, sowie eine detaillierte quantitative Charakterisierung des Kanalsystems adulter Schwämme, um damit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Schwammbiologie zu liefern. Für Untersuchungen des Wasserleitungssystems und der Knospenentwicklung kam die synchrotronstrahlungsbasierte Röntgen-Mikrotomografie zum Einsatz, die quantitative und qualitative Analysen der untersuchten Strukturen in ihrem natürlichen unveränderten Umfeld ermöglichte.

### **3D-Morphometrie zur Quantifizierung anatomischer Strukturen und räumlich-zeitlicher Muster**

Eine Reihe von Techniken ist verfügbar um morphologische Entwicklungsreihen im zeitlichen Kontext zu untersuchen. Synchrotronstrahlungsbasierte Röntgen-Mikrotomografie besitzt den Vorteil, dass sie Zugang zur detaillierten 3D-Morphologie der untersuchten Individuen liefert, ohne diese schneiden zu müssen (Nickel *et al.* 2006b; Nickel *et al.* 2008). Im Falle von Schwämmen können beispielsweise Strukturen wie die Skelettelemente (Spicula) in ihrem unveränderten räumlichen Kontext untersucht werden (Nickel *et al.* 2006a). Klassische histologische Semidünnschnitte und lichtmikroskopische Untersuchungen liefern zwar höhere Auflösungen, doch werden beim Schneiden selbst die Spicula zerstört, falls sie nicht zuvor herausgelöst werden müssen. Die Röntgen-Mikrotomografie sollte jedoch nicht als Ersatz für mikroskopische Techniken betrachtet werden, sondern als eine Erweiterung der verfügbaren Werkzeuge (Hörnschemeyer *et al.* 2002; Nickel *et al.* 2006b). Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie nicht auf die reine Visualisierung beschränkt ist. Sie erlaubt die Identifizierung und Quantifizierung morphologischer Muster anhand von 3D-Morphometrie (Nickel *et al.* 2006b). Dies erwies sich als eine wichtige Voraussetzung zur Beschreibung der spezifischen Knospenstadien in *T. wilhelma*. Die SR- $\mu$ CT basierten volumetrischen Analysen der anatomischen Hauptelemente (Wasserleitungssystem, Gewebe und Skelettelemente) lieferten essenzielle Informationen, die nötig waren, um eine sequenzielle Reihe von Knospenstadien zu beschreiben. Tatsächlich erlaubte die Röntgen-Mikrotomografie zum ersten Mal die asexuelle Vermehrung von Schwämmen quantitativ zu verfolgen.

### Zellulärer Aufbau des Wasserleitungssystems adulter Individuen von *Tethya wilhelma*

Ein funktionelles Wasserleitungssystem in Jungschwämmen stellt eine Voraussetzung für die in der Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur fütterungsinduzierten RNA-Interferenz dar. Daher wurde zunächst das Wasserleitungssystem adulter Individuen charakterisiert, um im Weiteren das früheste funktionelle Kanalsystem in sich entwickelnden Knospen zu identifizieren.

Den äußeren Abschluss des Schwammes an der Oberfläche und im Wasserleitungssystem bilden Pinacozyten, die je nach ihrer Lage im Schwamm in Exo-, Baso- und Endopinacozyten unterteilt werden können. Die Exopinacozyten, die den Schwamm an der Außenseite abschließen, wiesen in *T. wilhelma*, wie in vielen anderen Demospongien auch, einen T-förmigen Querschnitt auf (Abbildung 33A, siehe Boury-Esnault 1973). Diese finden sich neben den Demospongiae auch bei den Calcarea (Willenz & Hartman 1989). Im Exopinacoderm sind porenartige Öffnungen anzutreffen – die sogenannten Ostia. Durch diese gelangt das Wasser in das einführende Kanalsystem des Schwammes (Abbildung 31). Bei *T. wilhelma* wiesen Ostia einen Durchmesser zwischen 3 µm und 14,5 µm auf. Teilweise konnten mehrere dicht beieinandergelegene Ostia beobachtet werden, die auf diese Weise ein Porenfeld bildeten (Abbildung 31B). Diese Konstellation findet sich in vielen Schwämmen z. B. auch bei *Eunapius fragilis* (LEIDY, 1851) (Harrison *et al.* 1990). Im Bereich der Ostia stoßen Exo- und Endopinacoderm direkt aneinander. Wie die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in *T. wilhelma* zeigten, besteht eine geschlossene Verbindung zwischen Ostia und den darunter gelegenen Lakunen, die von Pinacozyten ausgekleidet sind (Abbildung 31D). Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich dabei um Endo- oder Exopinacozyten handelt. Die genaue Grenze an der diese beiden aneinanderstoßen konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestimmt werden. Ostia mit kleineren Durchmessern scheinen in *T. wilhelma* von einzelnen Zellen gebildet zu werden, jedoch waren die Zellgrenzen nicht immer eindeutig zu identifizieren. Ostia mit größerem Durchmesser hingegen werden von mehreren Zellen gebildet. Beide Typen wurden bisher für Demospongien dokumentiert. So wurden von verschiedenen Autoren Porozyten mit intrazellulären Poren (z. B. Harrison 1972; Reiswig 1975; Weissenfels 1980) aber auch interzelluläre Ostia (z. B. Simpson 1968) beschrieben. In *E. fragilis* konnten sowohl von einzelnen wie auch von mehreren Zellen gebildete Ostia beobachtet werden (Harrison *et al.* 1990). Die Fähigkeit Ostia innerhalb kurzer Zeiträume zu öffnen und zu schließen, und auf diese Weise den Wasserfluss zu regulieren, ist beispielsweise für *E. fluviatilis* und *Corvomeyenia carolinensis* HARRISON, 1971 und weitere Arten dokumentiert (Harrison 1972; Weissenfels 1980). Diese Fähigkeit kann dazu führen, dass nur wenige oder teilweise geschlossene Ostia in den untersuchten Exemplaren zu finden sind.

Endopinacozyten, die Kanal- und Lakunenwände im Inneren des Schwammes bilden, können in Prosendopinacozyten und Apendopinacozyten unterteilt werden. Die Prosendopinacozyten, welche die einführenden Wasserleitungssystembereiche auskleiden, wiesen in *T. wilhelma* stets eine flache Morphologie und einen spindelförmigen Querschnitt auf. Die Kanäle des ausführenden Wasserleitungssystems werden von Apendopinacozyten ausgekleidet. Diese tragen ein einzelnes Cilium von rund 6 µm Länge (Abbildung 32D, Abbildung 35). In einzelnen Fällen wurde für diese ein T-förmiger Zellkörper im Querschnitt beobachtet. Hierfür gibt es aber keine weiteren Hinweise in der Literatur. Monocilierte Apendopinaco-



zyten finden sich bei den Hadromerida auch in *Tethya lynchurium* (PALLAS, 1766)<sup>3</sup> und *Spirastrella cunctatrix* SCHMIDT, 1868, sowie in den meisten untersuchten Dictyoceratida und Dendroceratida (Pavans de Cecatty 1966; Vacelet *et al.* 1989; Boury-Esnault *et al.* 1990), wie auch in allen Homoscleromorpha (Boury-Esnault *et al.* 1984; Vacelet *et al.* 1989; Boury-Esnault 2006). Die Anwesenheit des Ciliums wird mit einer Rolle der Apendopinacozyten in der Wasserzirkulation im Kanalsystem in Zusammenhang gebracht. Für Vertreter der Homoscleromorpha wird eine aktive Beteiligung der monocillierten Apendopinacozyten an der Strömungserzeugung angenommen. In diesen Arten weisen die Apendopinacozyten ein im Vergleich zu *T. wilhelma* deutlich längeres Cilium auf. Aufgrund des relativ kurzen Ciliums von nur 6 µm Länge im Verhältnis zur Größe der Apendopinacozyten in *T. wilhelma* ist ein aktiver Beitrag zur Strömungserzeugung eher unwahrscheinlich. Vielmehr könnte es sich um ein Stereocilium handeln, dass eine Rolle in der Bestimmung der lokalen Strömungsgeschwindigkeit spielt. Jedoch liegen hierzu keine gesicherten Ergebnisse vor.

### Die Choanozytenkammern von *Tethya wilhelma*

Die Choanozytenkammern von *T. wilhelma* wiesen zwei Besonderheiten auf. Hierzu zählen die monocillierten Konuszellen in der Apopyle, die mit ihren in das Lumen der Choanozytenkammer ragenden Zellkörpern eine ringförmige Verengung bilden. Sie wurden erstmals in *E. fluviatilis* entdeckt (Weissenfels 1980). Wenige Jahre später wurde ein vergleichbarer Zelltyp in den Homoscleromorphen Schwämmen *O. lobularis* und *Corticium candelabrum* SCHMIDT, 1862 als Apopylenzelle dokumentiert (Boury-Esnault *et al.* 1984). Inzwischen wurden diese Zellen auch bei Dictyoceratida, Dendroceratida, Chondrosida, Halisarcida und Haplosclerida Arten nachgewiesen (Weissenfels 1980, 1981, 1982b; Langenbruch *et al.* 1985; Langenbruch 1988; Vacelet *et al.* 1989; De Vos & Boury-Esnault 1990; Langenbruch & Jones 1990; Langenbruch & Scalera Liaci 1990; Saller 1990). Damit konnten sie bisher in 6 der 14 Klassen der Demospongiae gefunden werden. Obwohl einige Hadromerida schon gezielt auf Konuszellen hin untersucht wurden, darunter z. B. auch *T. aurantium*, konnten diese dort zuvor nicht nachgewiesen werden. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass dieser Zelltyp in Semi-Dünnschnitten leicht zu übersehen ist, und sehr gut fixiertes Material für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen benötigt wird, um die Zellen in den Aufnahmen zu identifizieren. Daher ist zu erwarten, dass Konuszellen in Zukunft auch in weiteren Arten der Hadromerida, eventuell sogar in allen Demospongiae gefunden werden. Letztendlich könnten Konuszellen eine Autapomorphie der Demospongiae sein.

Das Vorkommen von konusartigen Apopylenzellen konnte bisher in allen beschriebenen Homoscleromorpha nachgewiesen werden (Boury-Esnault *et al.* 1984; Boury-Esnault 2006; Ereskovsky & Tokina 2007). Jedoch besitzen diese in *O. lobularis* und *C. candelabrum* einen Mikrovillisaum, der dieselbe Anzahl Mikrovilli aufweist, die auch im Kragen von Choanozyten dieser Arten zu finden sind. Es handelt sich dabei vermutlich um einen zweiten Typ von Apopylenzellen, der in Homoscleromorphen unabhängig entstanden ist. Dieser könnte eine Autapomorphie der Homoscleromorpha darstellen, da er in dieser Form bisher nur hier beschrieben wurde. Aufgrund der Ähnlichkeit des Mikrovillisaums der Apopylenzellen wird für diese bei den Homoscleromorpha eine Abstammung von Choanozyten vermutet (Boury-Esnault *et al.* 1984). Unterstützend für diese Hypothese wurde von Boury-Esnault (1990) angeführt, dass in den untersuchten *Halisarca*-Arten und in *P. ficiformis* Apopylenzellen monocilliert sind, wohingegen es Apendopinacozyten nicht sind. Dieses Argument ist unter Be-

<sup>3</sup> *T. lynchurium* ist ein nicht akzeptiertes Junior Synonym von *T. aurantium* (PALLAS, 1766), kann sich bei Arbeiten vor ± 1965 jedoch auch auf *T. citrina* Sarà & Melone 1965 beziehen.

rücksichtigung der aktuellen Phylogenie der Schwämme neu zu bewerten, da für die Homoscleromorpha nach aktuellen Erkenntnissen eine nähere Verwandtschaft zu den Calcarea angenommen wird (Philippe et al. 2009; Pick et al. 2010). Als alternative Hypothese wurde von früheren Autoren eine Abstammung der Konuszellen von monocilierten Apendopinacozyten angenommen. Hierfür spricht, zumindest in *T. wilhelma*, die größere Ähnlichkeit des kurzen Ciliums und der gesamten Zellmorphologie der Konuszellen mit den räumlich nahe gelegenen monocilierten Apendopinacozyten. Zur Klärung dieser Frage könnten zukünftige vergleichende ultrastrukturelle Untersuchungen dieser Zelltypen beitragen.

Ein bisher nicht beschriebener Zelltyp, der durch eine Vielzahl kleiner intrazellulärer Poren mit durchschnittlich  $0,5\ \mu\text{m}$  Durchmesser, eine netz- bzw. siebartige Struktur über der Apopylenöffnung bildet, stellt die zweite Besonderheit von Choanozytenkammern in *T. wilhelma* dar. Die Zellen selbst stehen auf der Choanozytenkammer zugewandten Seite mit Konuszellen, auf der Kanal zugewandten Seite mit Apendopinacozyten in Verbindung. Die von den Zellen gebildeten Poren konnten in geöffnetem und geschlossenem Zustand, wie auch in beiden Zuständen zugleich innerhalb einer Zelle beobachtet werden. Dies erinnert an Porozyten, die ebenfalls geöffnet und geschlossen werden können, vermutlich im Zusammenhang mit der Regulation des Wasserflusses. Eventuell dient dieser neue Zelltyp ebenfalls der Regulation des Wasserflusses im Schwamm, da er die partielle Abschaltung des Wasserstroms in einzelnen Bereichen des Schwammes ermöglichen könnte. Interessant ist ihre direkte Nachbarschaft zu den monocilierten Konuszellen, die ihr Cilium direkt in die Apopylenöffnung richten. Unter der Annahme, dass in *T. wilhelma* die monocilierten Konuszellen von monocilierten Apendopinacozyten abstammen, deren Stereocilium eventuell in die Bestimmung der vorherrschenden Strömungsverhältnisse involviert ist, könnten dieselbe Funktion auch auf Konuszellen zutreffen. Diese könnten mit ihrem Stereocilium als Strömungssensoren in Choanozyten fungieren und über angrenzende siebartige Zellen zu einer Regulation der Wasserströmung führen. Dies bleibt bis zur experimentellen Bestätigung nur eine Vermutung, da für beide Zelltypen die angenommenen Funktionen bisher nicht nachgewiesen werden konnten.

Eine durch die siebartige Struktur zunächst intuitiv naheliegende Funktion in der Filtration von Nahrungspartikeln ist für den neuen Zelltyp wahrscheinlich auszuschließen. Dagegen spricht zum einen, dass diese Zellen selbst vermutlich keine Nahrungspartikel aufnehmen können, und an diesen zurückgehaltene Partikel daher über längere Zeit zu einem Verschluss der Apopylenöffnung führen würden. Zum anderen sollten Partikel in Choanozytenkammern bereits am Mikrovillisaum der Choanozyten zurückgehalten werden (Riisgard & Larsen 2001; Leys & Eerkes-Medrano 2006). Der genaue Mechanismus der Filterwirkung der Choanozyten ist noch nicht verstanden. Mechanisch betrachtet könnte der Mikrovillisaum als Filter dienen, jedoch ist es wahrscheinlicher, dass Partikel sich aufgrund der vorherrschenden Strömungsverhältnisse an deren Oberfläche absetzen (Riisgard & Larsen 2001). Es wird angenommen, dass in Choanozytenkammern aufgrund einer niedrigen Reynoldszahl das Stokes'sche Gesetz gilt, dies führt dazu, dass Partikel die in die Nähe der Mikrovilli gelangen, aufgrund der Hydrodynamik an diese herangesaugt werden (Vogel 1983). Die Choanozytenkammern sind daher schon aufgrund der vorherrschenden Strömungsverhältnisse ein hoch effizientes Filtersystem. Dies zeigt, dass die Architektur der Wasserleitungssystemelemente einen großen Einfluss auf die vorherrschenden Strömungsverhältnisse und damit auf die Funktionalität hat. Für das Verständnis des Wasserleitungssystems in Schwämmen ist eine detaillierte Kenntnis der Morphologie und Architektur der Wasserleitungssystemelemente daher unerlässlich.

## Topologie des Wasserleitungssystems

Obwohl das Wasserleitungssystem eines der zentralen Elemente im Schwamm darstellt und dessen Bildung einen Hauptprozess im Verlauf des Wachstums und der Morphogenese darstellt, gibt es nur wenige umfassende Untersuchungen zu diesem (für eine Übersicht der früheren Literatur siehe Jones 1962). Die Hauptaufgabe des Wasserleitungssystems besteht in der Versorgung der umliegenden Gewebe mit Nährstoffen und dem Gasaustausch sowie dem Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Um diese komplexen Transportprozesse besser zu verstehen, werden biophysikalische Analysen der internen Strömungsverhältnisse benötigt. Diese erfordern jedoch neben quantitativen Daten zur Fluidodynamik auch eine detaillierte Kenntnis der Architektur des Kanalsystems. Auf dieses Problem wies schon Simpson (1984) in seinem Kompendium zur Biologie der Porifera hin und unterstrich die Notwendigkeit eines vollständigen dreidimensionalen Modells des Kanalsystems als essenzielle Voraussetzung für derartige Analysen.

Einen ersten bedeutenden Beitrag zu diesem Problem konnten Kanalsystemabgüsse des Wasserleitungssystems unterschiedlicher Schwammarten beisteuern (Bavestrello *et al.* 1988; Burlando *et al.* 1990; Bavestrello *et al.* 1995; Bavestrello *et al.* 1998; Bavestrello *et al.* 2002; Bavestrello *et al.* 2003). Sie ermöglichten erste allgemeinere Studien zum Aufbau des komplexen Netzwerks von Kanälen im Wasserleitungssystem von Schwämmen des Leucon Typs. Die Studien lieferten vor allem detaillierte Informationen zu verschiedenen Substrukturen des einführenden und ausführenden Wasserleitungssystems sowie deren Verbindungen untereinander. Die Bestimmung der Kanaldurchmesser an Bruchstücken erbrachten erste Ergebnisse zu Skalierungsfaktoren von Kanälen unterschiedlicher Verzweigungsebenen und damit quantitative Daten des Wasserleitungssystems, die Aussagen zu Strömungsverhältnissen in Kanalsystemabschnitten erlauben. In diesem Zusammenhang sind die umfangreichen Untersuchungen von Reiswig (1975) zum Wasserleitungssystem von *Halichondria panicea* (PALLAS, 1766), *Haliclona permollis* (BOWERBANK, 1866)<sup>4</sup> und *Microciona prolifera* (ELLIS & SOLANDER, 1786)<sup>5</sup> hervorzuheben, die anhand einer morphometrischen Auswertung von Kanalsystemelementen in Semi-Dünnschnitten in Kombination mit Messungen der Strömungsgeschwindigkeiten ein theoretisches Modell der Strömungsverhältnisse lieferten.

Ein erstes 3D-Modell des Wasserleitungssystems von adulten Individuen von *T. wilhelma* anhand virtueller Kanalsystemabgüsse, und davon abgeleitet, ein Modell des Aufbaus des Wasserleitungssystems und der vorherrschenden Strömungsrichtungen lieferte Nickel (2006b). Die Untersuchungen ergaben nicht nur zum ersten Mal ein dreidimensionales Modell des Wasserleitungssystems eines Schwammes, sondern darüber hinaus auch quantitative Daten wie Oberflächen zu Volumen Verhältnisse aus unterschiedlichen Bereichen des Kanalsystems. Damit wurden quantitative Daten im Kontext von Informationen zur Konfiguration eines Wasserleitungssystems von Schwämmen verfügbar, die für detaillierte biophysikalische Untersuchungen der internen Strömungsverhältnisse und physiologischer Parameter benötigt werden. Jedoch konnten in den Untersuchungen des virtuellen Kanalsystemabgusses von *T. wilhelma* kleinere Kanäle und Choanozytenkammern aufgrund des Auflösungslimits in den untersuchten Datensätzen nicht dargestellt werden.

<sup>4</sup> Akzeptiert als *Haliclona (Reniera) cinerea* (GRANT, 1826).

<sup>5</sup> Akzeptiert als *Clathria (Clathria) prolifera* (ELLIS & SOLANDER, 1786).

Die Grenze der erreichbaren Auflösung für die Mikro-Tomografie ist abhängig von der Lichtwellenlänge ( $\lambda$ ) und der numerischen Apertur ( $A$ ) des abbildenden Systems und ist bei einem System mit circularer Apertur unter incoherenter Beleuchtung als Auflösungsgrenze von  $\sim 0,61 \lambda/A$  gegeben (Born & Wolf 1999). Die Apertur wiederum ist von der gewählten Vergrößerung des optischen Systems abhängig, die dem Probendurchmesser entsprechend gewählt werden kann. Für die in der vorliegenden Arbeit an der Beamline BW2 verwendete Tomografieapparatur des GKSS-Forschungszentrums an der Strahlungsquelle DORIS III (DESY) bedeutet dies, dass die maximale Auflösung rund  $3 \mu\text{m}$  beträgt (Donath 2007). Dies kann aber nur mit Proben kleinen Durchmessers erreicht werden. Als Faustformel kann für die verwendete Apparatur eine Auflösung von rund  $1/1000$  des Probendurchmessers angenommen werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit neben kleineren adulten Exemplaren auch juvenile Individuen von *T. wilhelma* untersucht. Eine große Herausforderung bei der Erstellung von virtuellen Kanalsystemabgüssen aus Röntgen-Tomografiedaten stellt die Segmentierung der Wasserleitungssystembereiche dar, die zum Teil durch komplexe Bildverarbeitungstechniken überwunden werden können. Jedoch besitzen diese speziell im Bereich feiner Strukturen ebenfalls ihre Grenzen. Daher wurde neben virtuellen Kanalsystemabgüssen auch versucht durch Injektion eines Kunstharzes Kanalsystemabgüsse eines Wasserleitungssystems von *T. wilhelma* zu erstellen. Diese wurden anschließend ebenfalls röntgentomografisch untersucht.

### Architektur von Flüssigkeitstransportsystemen

Die Architektur von Flüssigkeitstransportsystemen, wie des Wasserleitungssystems in Schwämmen oder des Blutkreislaufsystems der Mammalia, die dem Transport von Nährstoffen innerhalb eines Organismus bzw. zwischen einem Organismus und der Umwelt dienen, wird durch Randbedingungen beeinflusst, die einen effizienten Transportprozess beschränken. Hierzu zählen in Schwämmen beispielsweise die Reichweite von diffusionslimitierten Prozessen, wie dem Sauerstofftransport in umliegende Gewebe (Hoffmann *et al.* 2005a), oder hydrodynamische Beschränkungen (Davies 1989), sowie die energetischen Kosten für Bildung und Unterhaltung des Systems. Für ein perfekt designtes Flüssigkeitstransportsystem bedeutet dies, das in der Gleichung:

$$r_1^\Delta = r_2^\Delta + r_3^\Delta + \dots + r_n^\Delta$$

für  $\Delta = 3$  gilt. Dieses Prinzip wird auch als Murrays Gesetz beschrieben und stellt bisher die beste Abschätzung für die Effizienz eines sich verzweigenden Flüssigkeitstransportsystems dar (Murray 1926; LaBarbera 1990). In der Tat hat sich gezeigt, dass es die Architektur einer Vielzahl unterschiedlicher Flüssigkeitstransportsysteme in der Biologie erstaunlich gut beschreibt. Dies trifft unter anderem auf die Blutkreislaufsysteme von Vertebraten (mit Ausnahme einzelner Abschnitte im Bereich des Herzens) und Invertebraten, Teile des Schwammwasserleitungssystems und sogar die feinen Gefäße in Blättern von Sonnenblumen zu (LaBarbera 1990; Canny 1993; Marcinek & Labarbera 1994). Es kann sogar auf sich verzweigende Systeme angewandt werden, die nicht dem Flüssigkeitstransport, sondern dem Transport von Gasen dienen. Dies konnte am Beispiel des Bronchialsystems der menschlichen Lunge gezeigt werden (Weibel & Gomez 1962).

Verbal ausgedrückt besagt Murrays Gesetz, dass in einem perfekt aufgebauten Flüssigkeitstransportsystem die Summe der Kanaldurchmesser der Tochter-Äste hoch drei gleich dem Durchmesser des sich verzweigenden Kanals hoch drei ist. Dies bedeutet, dass in einem sich regelmäßig zweifach symmetrisch verzweigenden System die Kanaldurchmesser nach

jeder Verzweigung nur noch 79,4 % des Durchmessers vor der Verzweigung betragen. Die Querschnittsfläche der Kanäle nach der Verzweigung beträgt damit für jeden von diesen nur noch 63 % der ursprünglichen Querschnittsfläche. In der Summe aber vergrößert sich diese, und aufgrund der Kontinuität der Strömung verringert sich die Strömungsgeschwindigkeit damit in jedem Schritt um 26 % (Vogel 1983). Auf Schwämme übertragen bedeutet dies, dass nach einer relativ geringen Anzahl von 10 bis 15 Verzweigungen die Fließgeschwindigkeit bereits deutlich reduziert ist (ca. 1 mm/sec), dann aber über einen größeren Bereich von Verzweigungshierarchien eine relativ geringe Strömung aufweist, da die absolute Reduktion der Fließgeschwindigkeit in jedem Schritt kleiner wird. Damit sind vermutlich Fließgeschwindigkeiten erreicht, die für eine Aufnahme von Partikeln aus dem Wasser gering genug sind. Es scheint daher einen größeren Bereich von Kanalhierarchien zu geben, der für die Nahrungsaufnahme und den Gasaustausch genutzt werden kann. Durch die enorme Vergrößerung der Querschnittsfläche im Bereich der Choanozytenkammern kommt es dann in diesem letzten Verzweigungspunkt noch einmal zu einer deutlichen Reduktion der Strömungsgeschwindigkeiten. Entsprechend ergaben sich im Strömungsgeschwindigkeitsmodell für Schwämme von Reiswig (1975) aufgrund der stark vergrößerten Querschnittsfläche im Bereich der Choanozyten, dort die langsamsten Strömungsgeschwindigkeiten.

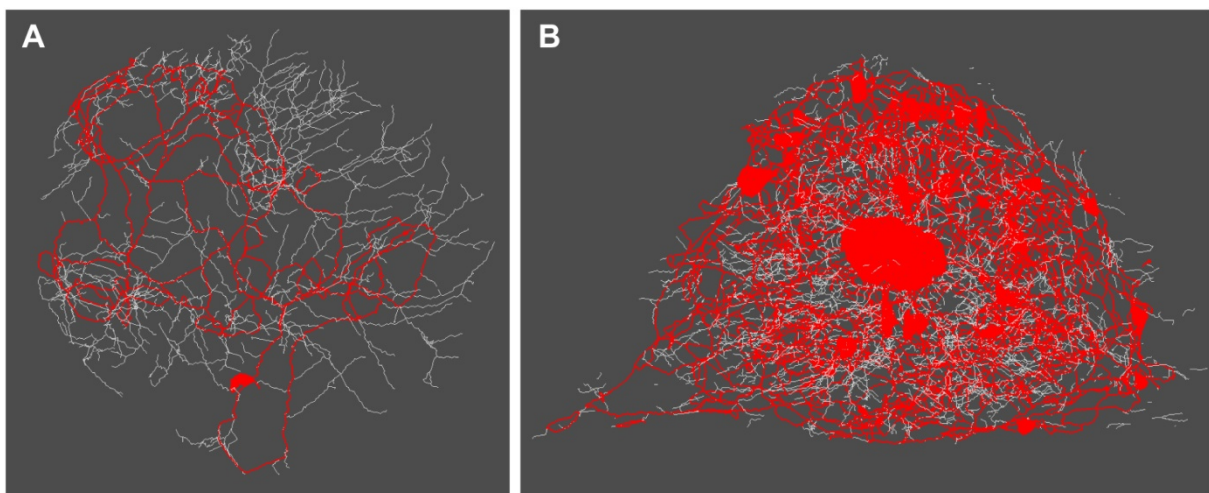
### Architektur des Wasserleitungssystems in *Tethya wilhelma*

Die näherungsweise Bestimmung des Parameters  $\Delta$  für ein Subvolumen eines Kanalsystemabgusses von *T. wilhelma* zeigte, dass diese eine hoch effiziente Architektur des Wasserleitungssystems aufweisen. In *T. wilhelma* ergaben sich  $\Delta$ -Werte zwischen 1 und 22. Jedoch konnte nicht für alle Verzweigungspunkte eine Lösung erhalten werden, da in einigen Fällen keine Lösung der Gleichung aus der Menge der reellen Zahlen existiert. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn T-förmige Verzweigungen im Kanalsystem zu keiner Reduktion des Kanaldurchmessers hinter den Verzweigungspunkten führen. Betrachtet man nur die Werte aus sich regelmäßig verzweigenden Bereichen des Kanalsystems die zwischen 1 und 6 zu finden sind, ergibt sich im Mittel ein Wert von 3. Damit würde das Kanalsystem, zumindest das untersuchte Subvolumen, einem Flüssigkeitstransportsystem mit hoch effizienter Architektur entsprechen. Frühere Arbeiten an *H. panicea*, *Microciona prolifera* (ELLIS & SOLANDER, 1786) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie zeigten jedoch auch, dass dies nicht für alle Bereiche des Kanalsystems zutrifft (LaBarbera 1990). In *S. officinalis*, *C. reniformis* und *S. carnosus* hingegen ergaben sich im Mittel  $\Delta$ -Werte von 2, wobei speziell im Bereich der Kanäle zwischen 10  $\mu\text{m}$  bis 30  $\mu\text{m}$  Werte um 3 und darüber zu beobachten waren (Bavestrello *et al.* 1995). Dies deckt sich mit den für *T. wilhelma* ermittelten Ergebnissen, wo ebenfalls Werte zwischen 1 bis 1,5 und zwischen 2,5 und 3 besonders häufig zu beobachten waren. Die Werte stellen vermutlich lokale beste Lösungen dar, wie sie oft in biologischen Systemen zu beobachten sind (Pérez-Escudero *et al.* 2009). Die  $\Delta$ -Werte müssen daher im Kontext der gesamten Anatomie des Schwammes betrachtet werden. In *T. wilhelma* müssen im Aufbau der Kanalsystemarchitektur sowohl die Versorgung der umliegenden Gewebe wie auch die für die stabilisierende Funktion der Skelettelemente geltenden Voraussetzungen berücksichtigt werden. Dies wird in bestimmten Bereichen zu Kompromissen führen, die eine lokale angepasste Lösung darstellen, aber von einer idealen Lösung abweichen. Derartige Beschränkungen und Randbedingungen finden in der theoretischen und idealen Betrachtung des Murrays Gesetz keine Berücksichtigung und führen damit zu einer Abweichung in realen Systemen.

### Verzweigungshierarchien des Wasserleitungssystems

Für das Subvolumen eines Kanalsystemabgusses eines adulten Exemplars von *T. wilhelma* konnten Daten zu Verzweigungshierarchien in Kombination mit Informationen zu Kanaldurchmessern erhoben werden. Die Analysen der Kanaldurchmesser zeigten, dass es keine abgegrenzten Größenklassen unterschiedlicher Hierarchiestufen gibt. Dies weist darauf hin, dass nicht die Kanaldurchmesser allein die Funktionalität einzelner Kanalabschnitte bedingen. Vielmehr sind es vermutlich Randbedingungen der Hydrodynamik, die die Länge und den Durchmesser eines Kanals bestimmen. In Kombination ergeben sich so vermutlich für die einzelnen Hierarchiestufen der Kanalabschnitte Strömungsverhältnisklassen und nicht Größenklassen. Diese sind jedoch aufgrund der nicht symmetrischen Kanalquerschnitte nur schwierig zu berechnen, könnten aber eine weitaus bessere Abschätzung liefern. Zudem würden diese indirekt auch biologisch wesentlich relevantere Informationen enthalten. Die Grenzfläche in den vorherrschenden Strömungsverhältnissen eines Kanals, in der eine Aufnahme von Nahrungspartikeln möglich ist, hängt vom Durchmesser des Kanals und der Strömungsgeschwindigkeit des Wassers in diesem ab. Damit könnten Bereiche im Schwamm identifiziert werden, die eine Aufnahme von Nahrungspartikeln begünstigen.

Die vorliegenden Datensätze erlauben noch keine Bestimmung von Daten zu Verzweigungshierarchien von Kanälen in Kombination mit Kanaldurchmessern für einen vollständigen Kanalsystemabguss. Die Herausforderung besteht in den, durch Bypasselemente und Anastomosen im Kanalsystem hervorgerufenen Ringstrukturen (Abbildung 46), die eine automatische Klassifizierung der Kanalsystemabschnitte anhand eines Algorithmus verhindern. Ähnliche Probleme ergeben sich auch in der Analyse anderer verzweigter biologischer Systeme, z. B. bei Korallen (Kruszyński *et al.* 2007). Die zurzeit für derartige Analysen verfügbaren Algorithmen sind nicht in der Lage Ringstrukturen in hierarchischen Bäumen korrekt aufzulösen. Für die Zukunft werden daher Algorithmen benötigt, die in der Lage sind mit derartigen Strukturen umzugehen, indem sie entweder allen an der Ausbildung der Ringstruktur beteiligten Abschnitte dieselbe Hierarchiestufe zuweisen oder diese symmetrisch in zwei geteilte Bereiche derselben Hierarchiestufe unterteilen.



**Abbildung 46:** Ringstrukturen (rot) im Gerüst (weiß) des Wasserleitungssystems zweier adulter Individuen von *T. wilhelma*, die eine automatische Analyse der Verzweigungshierarchien verhindern.

Für das unter Ausschluss von Ringstrukturen untersuchte Subvolumen ergaben sich sechs Hierarchiestufen, wobei die beiden letzten Klassen auf demselben Kanalabschnitt zu finden sind und daher zusammengefasst werden können (Abbildung 39A). Eventuell enthielt der Datensatz in diesem Bereich noch einen kurzen Seitenast, der durch Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche des Kanalsystemabgusses bei der Berechnung des Wasserleitungssystemgerüsts entstand. Zwischen den einzelnen Kanalhierarchien ergaben sich Skalierungsfaktoren für die mittleren Durchmesser zwischen 1,1 und 1,5. Die Größenklassen der Kanäle in den einzelnen Hierarchiestufen überlappten sich sehr stark, sodass eine Klassifizierung anhand von Kanaldurchmessern wie bei *P. ficiformis* und *Chondrosia reniformis* NARDO, 1847 nicht möglich war (Bavestrello *et al.* 1988). Im selben Subvolumen wurden die Kanalhierarchien ebenfalls unter Berücksichtigung der Ringstrukturen manuell bestimmt (Abbildung 39B). In diesem Fall ergaben sich sechs Hierarchiestufen, die zu einer feineren Abstufung der mittleren Kanaldurchmesser der einzelnen Größenklassen führten. Damit variierten die Skalierungsfaktoren der Kanaldurchmesser zwischen den einzelnen Hierarchiestufen nur zwischen 1,2 und 1,5. Eine deutliche Änderung der Skalierungsfaktoren zwischen Größenklassen kleinerer Kanaldurchmesser und größerer Kanaldurchmesser wie bei *Spongia officinalis* LINNAEUS, 1759<sup>6</sup>, *C. reniformis* und *Suberites carnosus* (JOHNSTON, 1842) konnten bei *T. wilhelma* nicht beobachtet werden (Bavestrello *et al.* 1995).

### Morphometrische Analysen gesamter Kanalsystemabgüsse

Die von mir bestimmten morphometrischen Daten umfassten Kanaldurchmesser, Länge der Kanalabschnitte zwischen Gabelungen, Verzweigungswinkel und die Abstände benachbarter endständiger Kanalabschnitte. Die Analysen der Kanaldurchmesser (Abbildung 38A-B, Abbildung 41) zeigte, dass die bestimmten absoluten Werte nur wenig Aussagekraft für die Charakterisierung der Kanalsysteme besitzen, da sie stark von der Größe der untersuchten Individuen abhängen.

Für die untersuchten adulten Exemplare zeigte sich, dass besonders Kanäle mit kleineren Durchmessern (< 60 µm – 65 µm) deutlich häufiger vertreten sind (Abbildung 38A, B, Abbildung 41C). Ein vergleichbares Muster konnte auch bei juvenilen Schwämmen beobachtet werden. Jedoch sind die Kanaldurchmesser bei diesen geringer (Abbildung 41A). Die Beobachtungen in einem weiteren virtuellen Kanalsystemabguss eines adulten Exemplars von *T. wilhelma* wichen von diesem Muster ab. Sie erwecken den Eindruck einer Normalverteilung der Kanaldurchmesser (Abbildung 41B). Jedoch konnten in diesem Datensatz eine Vielzahl der Kanäle mit kleineren Durchmessern nicht erfasst werden, da die Auflösung der SR-µCT Daten zu gering war. Unter funktionellen Gesichtspunkten ist ein Verteilungsmuster wie es beobachtet wurde zu erwarten. Kanäle mit kleineren Durchmessern sollten wesentlich häufiger zu finden sein als größere Kanäle, da nur in den Kanälen mit kleinem Durchmesser die für eine effiziente Nahrungsaufnahme und Gasaustausch benötigten Strömungsverhältnisse vorherrschen. Die Strömungsverhältnisse sind aufgrund der Kontinuität der Strömung direkt von der im System in bestimmten Bereichen vorhandenen Gesamtquerschnittsfläche abhängig. Die deutlich größere Zahl an Kanälen mit kleinen Durchmessern führt zu einer enormen Vergrößerung der gesamten Querschnittsfläche des Systems in diesem Bereich und damit zu einer Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit in diesen Abschnitten. Diese sind in Schwämmen funktionell mit den Choanozytenkammern, bzw. den direkt zu- und abführenden Kanälen davor und danach in Verbindung zu setzen.

<sup>6</sup> Akzeptiert als *Spongia (Spongia) officinalis* LINNAEUS, 1759.



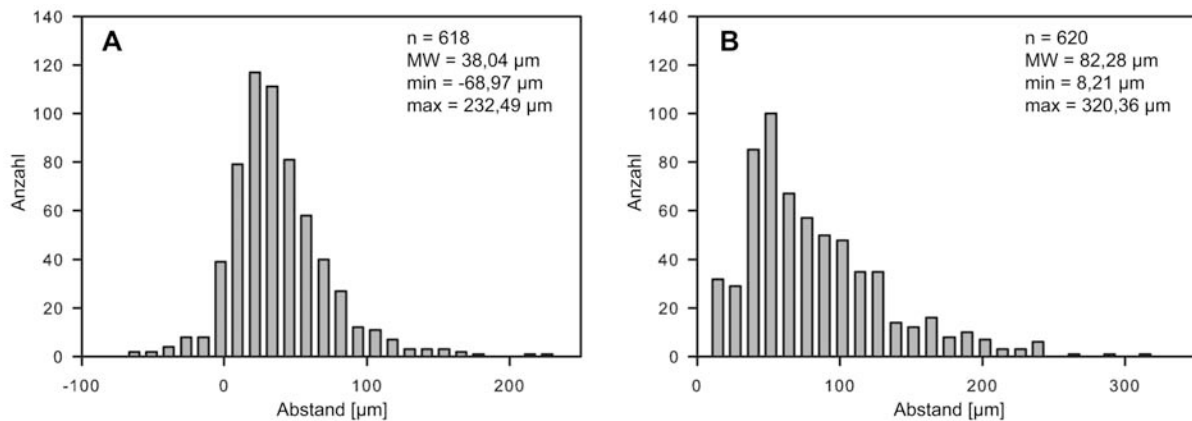
Die ermittelten Längen der Kanalabschnitte wurden deutlich von kurzen Kanälen dominiert (Abbildung 38C). Ein Großteil der kurzen Kanäle ist vermutlich auf die endständigen Abschnitte, die zumeist Abzweigungen in Choanozytenkammern darstellen, zurückzuführen. Auch die kompakte Architektur, die sich aus der Kugelform von *T. wilhelma* ergibt, könnte dazu führen, dass viele kurze Kanäle benötigt werden, um im begrenzten zur Verfügung stehenden Raum, die für die Reduktion der Strömungsgeschwindigkeit benötigte Anzahl an Verzweigungen, zu realisieren. Es ist ebenfalls zu bedenken, dass im selben Bereich sowohl die Verzweigungen für das einführende wie auch das ausführende Wasserleitungssystem untergebracht werden müssen. Die beiden Systeme sind ineinander verwoben, da das Wasser zunächst von der Oberfläche ins Zentrum des Schwammes (Choanosom) und anschließend von dort wieder zurück transportiert werden muss. Jedoch konnten auch sehr lange kontinuierliche Kanalabschnitte bis 600 µm beobachtet werden. Hierbei könnte es sich um ein Artefakt handeln, da in einem Teilbereich des Abgusses das Kunstharz nicht weiter in fein verzweigte Regionen des Kanalsystems eingedrungen ist und sich daraus ein langer Kanalabschnitt ohne weitere Verzweigungen ergibt.

Die bestimmten Verzweigungswinkel wiesen annähernd eine Normalverteilung auf und es ergaben sich im Mittel Werte von 94° (Abbildung 38D). Auf diese Weise sollte sich ein möglichst geringer Strömungswiderstand aufgrund der Verzweigungsgeometrie ergeben. Die Werte liegen damit auch in einem Bereich wie sie ebenfalls für Bifurkationen von Blutgefäßsystemen vorhergesagt wurden (Zamir 1976). Die beobachteten flachen Verzweigungswinkel sind auf T-förmige Verzweigungen zurückzuführen. Diese finden sich teilweise im Kanalsystem, wobei es oft zu keiner Reduktion der Kanaldurchmesser hinter der Verzweigung kommt. In der vorliegenden Analyse ergeben sich diese auch in den Bereichen der Lakunen und sind in diesem Fall ein Artefakt des Skeletonisierungsalgorithmus.

### **Verteilung fein verzweigter Kanäle im Gewebe**

Um eine gleichmäßige Versorgung aller Bereiche mit Nährstoffen und vor allem Sauerstoff sicherzustellen, sollte es zu einer gleichmäßigen Verteilung von Kanälen im Gewebe kommen. Die Abstände zwischen den Kanälen ist zum einen von weiteren anatomischen Strukturen wie dem Skelett, aber auch von diffusionslimitierten Prozessen wie dem Sauerstofftransport abhängig. Da die Effizienz in diffusionslimitierten Prozessen über die Distanz abnimmt (Hoffmann *et al.* 2005a), ist ein Verteilungsmuster von Kanälen zu erwarten, welches eine kontinuierliche Versorgung der Zellen mit Sauerstoff gewährleistet. Für Schwämme, die anaerobe Bakterien als Symbionten aufweisen, konnten anoxische Bereiche, in denen die Bakterien angesiedelt sind, nachgewiesen werden (Hoffmann *et al.* 2005b). Dies stellt genau den umgekehrten Fall dar, beruht aber auf den gleichen Grundannahmen.

Für *T. wilhelma* wurden daher die Abstände terminaler Kanäle in Wasserleitungssystemabgüssen bestimmt. Diese sollten Aufschlüsse über die durch die Kanäle versorgten Bereiche des Gewebes geben. Jedoch besitzen die ermittelten Werte nur eine begrenzte Aussagekraft, da sie noch die Radien der betreffenden Kanäle enthalten. Sie stellen somit den Abstand des berechneten Wasserleitungssystemgerüsts in diesem Bereich, und nicht den biologisch relevanten Abstand zwischen Kanaloberflächen dar (Abbildung 38E). Damit sind keine gesicherten Aussagen im Zusammenhang mit diffusionslimitierten Prozessen möglich. Um den korrekten Abstand zu bestimmen, müssten von den ermittelten Werten die Radien der betreffenden Kanäle abgezogen werden. Da der Abstand der Kanäle durch



**Abbildung 47:** Vergleich der Häufigkeiten von Abständen terminaler Kanäle unter Berücksichtigung der Kanaldurchmesser (näherungsweise) (A) und ohne Verrechnung der Kanaldurchmesser (B).

Einpassen von Sphären ausgehend vom berechneten Wasserleitungssystemgerüst bestimmt wurde, müssten sowohl der Radius des Kanals von dem die Messungen ausgehen, wie auch des angrenzenden Kanals abgezogen werden. Der eingesetzte Algorithmus erfasste nicht eindeutig die benachbarten Kanäle. Daher könnte der korrekte Abstand nur näherungsweise bestimmt werden, indem der doppelte Radius des Kanals, von dem die Messungen ausgehen, von den bestimmten Abständen abgezogen wird. Dies führt in einigen Fällen aber zu negativen Ergebnissen (Abbildung 47A). Dieser Fall tritt ein, wenn der benachbarte Kanal einen wesentlich kleineren Durchmesser aufweist, als der Kanal in dessen Zentrum sich der Mittelpunkt der eingepassten Sphäre zur Bestimmung des Abstandes befindet (vgl. Abbildung 14). Daher konnte ausgehend von diesen Werten nur ein näherungsweise Intervall für die mittleren Kanalabstände bestimmt werden. Dieses erstreckt sich zwischen den Mittelwerten der beiden Histogramme von 38 µm bis 82 µm (Abbildung 47). Die untere Grenze stellt sicher eine Überschätzung, die obere vermutlich eine geringe Unterschätzung dar. Es ergibt sich damit jedoch ein Bereich, der auch für diffusionslimitierte Prozesse eine Versorgung der Gewebe sicherstellt. In Explantaten von Schwammgeweben konnte gezeigt werden, dass eine Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff nur durch Diffusionsprozesse selbst über größere Distanzen gewährleistet ist (Hoffmann *et al.* 2005a). Die Diffusionsraten jedoch sind von Konzentrationsgefällen abhängig. Unterbleibt die Pumpaktivität der Schwämme, so bilden sich innerhalb kurzer Zeit anaerobe Bereiche im Gewebe, in die aufgrund einer zu niedrigen Sauerstoffkonzentration im umgebenden Wasser kein Transport mehr stattfindet (Hoffmann *et al.* 2005a; Hoffmann *et al.* 2005b). Da in den fein verzweigten Kanalabschnitten die Fließgeschwindigkeit des Wassers extrem verlangsamt ist könnte dies dazu führen, dass der Sauerstoffgradient zwischen dem transportierten Wasser und den umliegenden Geweben schnell abnimmt und für einen effektiven Transport über größere Distanzen limitierend wird. Daher könnte in diesen Abschnitten des Wasserleitungssystems eine größere Dichte an Kanälen, wie sie bei *T. wilhelma* zu beobachten ist, von Nöten sein, um die Sauerstoffversorgung der Gewebe sicherzustellen.

### **Bypasselemente – Ein Bruch der unidirektionalen Verbindungen in Schwamm-Wasserleitungssystemen**

Der Kanalsystemabguss, der durch Injektion von Kunstharz in das Wasserleitungssystem erstellt wurde, zeigt größtenteils Bereiche des ausführenden Kanalsystems. Auf der Oberfläche der fein verzweigten Kanäle des Abgusses konnte eine Vielzahl von kleinen

kugelförmigen Erhebungen beobachtet werden. Diese stellen vermutlich Abdrücke der Apopylenöffnungen dar. Das Kunstharz konnte wahrscheinlich aufgrund der Viskosität nicht in Choanozytenkammern eindringen. Vergleichbare Beobachtungen ergaben auch frühere Arbeiten mit Kanalsystemabgüssen, bei denen ebenfalls das injizierte Kunstharz niemals aus Choanozytenkammern in Abschnitte des einführenden Kanalsystems übertrat (Bavestrello *et al.* 1995). Jedoch konnten in den untersuchten Kanalsystemabgüssen von *T. wilhelma* dennoch Bereiche des einführenden Kanalsystems erhalten werden. Dies weist auf eine direkte Verbindung des ausführenden mit dem einführenden Kanalsystem hin.

Dies wurde bereits von Bavestrello (1988) beobachtet und führte zur ersten Beschreibung von Bypasselementen im Wasserleitungssystem von Schwämmen. Damit ergibt sich eine nicht unidirektionale Verbindung von einführendem und ausführendem Wasserleitungssystem durch die Ausbildung von ringförmigen Verbindungen. Dadurch kann es theoretisch zu einer Zirkulation des Wassers aus dem ausführenden zurück in Bereiche des einführenden Wasserleitungssystems kommen (Abbildung 37E). Ihr Vorkommen konnte in unterschiedlichen Demospongien nachgewiesen werden und scheint keine Ausnahme darzustellen (Bavestrello *et al.* 1988; Burlando *et al.* 1990; Bavestrello *et al.* 1995; Nickel *et al.* 2006b).

Im Kanalsystemabguss von *T. wilhelma* konnten mehrere Kanäle mittleren Durchmessers als direkte Verbindungen zwischen einer Lakune und dem Atrium identifiziert werden, über die das Wasser den Schwamm, ohne Choanozytenkammern zu passieren, wieder verlassen kann (Abbildung 37C-E). Die genaue Funktion der Bypasselemente ist bisher unklar, jedoch wurde vermutet, dass sie zur Reduktion von Druckspitzen im Kanalsystem durch eine Verringerung des hydraulischen Widerstandes führen könnten (Vogel 1983; Burlando *et al.* 1990; Nickel *et al.* 2006b). Dies könnte beispielsweise bei den regelmäßigen Körperkontraktionen von *T. wilhelma* eine Rolle spielen, da sich im Verlauf der Kontraktion das Volumen des Kanalsystems um bis zu 90 % verringert und das somit verdrängte Wasser in kurzer Zeit aus dem Schwamm gedrückt wird. Die Bypasskanäle könnten hierbei durch einen Druckausgleich Beschädigungen in fein verzweigten Bereichen des Wasserleitungssystems verhindern. Die Beobachtungen, die sich aus den Schwierigkeiten bei der Anfertigung vollständiger Kanalsystemabgüsse ergeben, welche eventuell auf einen Druckabfall durch die Bypasselemente zurückzuführen sind, könnten ein Hinweis für diese Hypothese sein. Unter physiologischen Gesichtspunkten könnten die Bypasskanäle vorteilhaft sein, indem sie durch einen erhöhten Wasserstrom in Teilbereichen des Kanalsystems zu einer Verdünnung von ins Wasser ausgeschiedenen Stoffwechselprodukten beitragen. Der erhöhte Wasserstrom von frischem unverbrauchtem sauerstoffgesättigtem Wasser, das über die Bypasselemente direkt in das ausführende Wasserleitungssystem gelangt, könnte auch für die Sauerstoffversorgung der Schwammzellen in diesem Bereich von Nöten sein. In diesen Abschnitten des Kanalsystems könnte aufgrund einer bereits stark erniedrigten Sauerstoffkonzentration im Wasser, welches die Choanozytenkammern passiert hat, eventuell kein effektiver diffusionslimitierter Transport mehr möglich sein. Hierzu gibt es jedoch bisher keine experimentellen Daten. Hinreichend kleine Sauerstoffelektroden, die derartige Messungen ermöglichen würden, sind zurzeit noch nicht verfügbar.

### Das Lakunensystem in *Tethya wilhelma*

Der untersuchte virtuelle Kanalsystemabguss eines Jungschwamms von *T. wilhelma* wies im Vergleich zu adulten Individuen keine grundlegenden Unterschiede im Aufbau des Kanalsystems auf (Abbildung 36). Wie in adulten Exemplaren konnte bei Jungschwämmen ein weitverzweigtes Netzwerk von Lakunen im Cortex vorgefunden werden. Die Kanäle des Lakunennetzwerks wiesen in juvenilen Exemplaren noch einen eher runden Querschnitt auf (Abbildung 36A, C), wohingegen diese in adulten Individuen großflächiger ausgebildet sind (Abbildung 36B, D). Das darunter gelegene Netzwerk des Sublakunarsystems war bereits deutlich ausgebildet und steht in direkter Verbindung mit einem dichten Netzwerk von Kanälen des einführenden Wasserleitungssystems im Choanosom. Verbindende Kanäle zwischen dem Lakunensystem und dem Sublakunarnetzwerk konnten im Kanalsystemabguss des juvenilen Schwammes nicht gefunden werden. Ein Nachweis von diese war in den ersten Untersuchungen von Nickel (2006b) an adulten Individuen von *T. wilhelma* ebenfalls nicht möglich.

Untersuchungen an Kanalsystemabgüssen von *T. aurantium* zeigten Abschnitte innerhalb eines größeren Kanals, die sich im Grenzbereich zwischen Cortex und Choanoderm, in kleinere Kanäle aufspalten, um anschließend wieder zu einem größeren Kanal zu fusionieren (Bavestrello *et al.* 1998). Dies könnte ebenfalls auf die verbindenden Kanäle zwischen Lakunen des Cortex und des Sublakunarsystems in *T. wilhelma* zutreffen, da diese denselben Bereich überspannen. In den von mir untersuchten Kanalsystemabgüssen von juvenilen Exemplaren konnten sich verjüngende Kanäle, die ausgehend von Lakunen in Richtung des Sublakunarsystems gerichtet waren, beobachtet werden (Abbildung 36F). Eventuell konnte die direkte Verbindung der beiden Lakunensysteme trotz der hohen Auflösung von 1,6 µm Pixelgröße nicht aufgelöst werden.

Im Gegensatz dazu wurden diese verbindenden Kanäle in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten virtuellen Kanalsystemabgüssen adulter Exemplare eindeutig nachgewiesen (Abbildung 36B). Eventuell führt in diesem Fall die geringere Auflösung des SR-µCT-Datensatzes dazu, dass mehrere feine Kanäle durch Fusionierung in den Bilddaten sichtbar werden. Es könnte sich aber auch tatsächlich um größere verbindende Kanäle handeln, die in Jungschwämmen noch schwach ausgebildet sind. Für den letzteren Fall spricht die Beobachtung, dass in Kanalsystemabgüssen von Jungschwämmen die Verbindung des Atrium-Bereiches im Abschnitt zwischen Cortex und Choanoderm, eine Aufspaltung in kleinere Kanäle erfährt, die anschließend wieder zu einem Kanal fusionieren. Dies ist in adulten Exemplaren nicht mehr anzutreffen. In diesen erstrecken sich ein oder mehrere große Kanäle, die im Bereich vor dem Osculum das Atrium bilden, quer durch den ganzen Schwammkörper.

Der Abguss eines Jungschwamms von *T. wilhelma* zeigte auf der Oberfläche des Lakunennetzwerkes Erhebungen, die vermutlich Porenfelder von Ostia darstellen (Abbildung 36E). Einzelne Ostia konnten aufgrund des Auflösungslimits nicht dargestellt werden. Hierfür spricht die Beobachtung, dass an vergleichbarer Stelle im Kanalsystemabguss eines adulten Individuums überschüssiges Kunstharz ausgetreten ist (Abbildung 37C).

### Technisches Verbesserungspotenzial für Untersuchung des Wasserleitungssystems

Für weiterführende Untersuchungen von Schwammkanalsystemen könnten neue zur Verfügung stehende Materialien für Kanalsystemabgüsse, wie das auf Polyurethan-Basis entwickelte PU4ii, das eine niedrigere Viskosität aufweist und über einen längeren Zeitraum während der Perfusion behält, hilfreich sein (Krucker *et al.* 2006). Mit ihnen könnte es gelingen annähernd vollständige Abgüsse, die auch größere Bereiche des einführenden Kanalsystems enthalten, zu gewinnen. Auch die Anfertigung von virtuellen Kanalsystemabgüssen anhand von SR- $\mu$ CT Daten könnte verbessert werden, indem durch eine bessere Kontrastierung des Mesohyls der Schwämme ein größerer Kontrastunterschied zu Kanalbereichen erreicht wird. Dies könnte durch gewebespezifische Gold oder Silber gekoppelte Antikörper-Färbungen erreicht werden (Turner *et al.* 2003). Die so gewonnenen und bereits verfügbaren Kanalsystemabgüsse würden für Subvolumen oder gesamte Wasserleitungssysteme die Simulation von Strömungsverhältnissen in Schwammkanalsystemen in Computational-Fluid-Dynamics-Modellen (CFD) ermöglichen. Damit könnte ein großer Beitrag zum Verständnis der Biologie von Schwämmen geliefert werden. Mit Hilfe von Netzwerkanalysewerkzeugen (z. B. NetworkX, Hagberg *et al.* 2008) aus der Graphentheorie können Parameter wie der Durchmesser des Netzwerks, kritische Knotenpunkte, Cluster und Einzugsbereiche von Knoten bestimmt werden, die Aussagen über die Wichtigkeit einzelner Kanalsystemabschnitte erlauben (Boccaletti *et al.* 2006; Bullmore & Sporns 2009; Bialonski *et al.* 2010). Darüber hinaus könnte die Robustheit des Netzwerkes ermittelt werden, die eine Aussage über die Folgen des Ausfalls einzelner Kanalabschnitte erlauben und somit zum Verständnis des Aufbaus und der Funktion des Wasserleitungssystems beitragen. Sowohl die Netzwerkanalyse wie auch CFD-Modelle könnten dazu beitragen die Funktion der Bypasselemente in Schwämmen besser zu verstehen.

### Wie kann das Wasserleitungssystem von Schwämmen verstanden werden?

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass das Wasserleitungssystem von Schwämmen ein hoch effizientes Flüssigkeittransportsystem ist. Die Architektur folgt den durch die physikalischen Gesetzmäßigkeiten der Hydrodynamik gegebenen Randbedingungen unter Berücksichtigung der weiteren Anatomie der Schwämme. Die beobachteten Durchmesser, Verzweigungswinkel, Längen der Kanalabschnitte und die Verteilung der Kanäle im Gewebe weisen darauf hin, dass größere Bereiche als bisher angenommen relativ langsame Strömungsverhältnisse aufweisen, die für den Gasaustausch und die Nahrungsaufnahme zur Verfügung stehen. Der durch den Schwammkörper gegebene Raum für die Ausbildung eines Wasserleitungssystems zugänglich ist wird bestmöglich genutzt um eine hocheffiziente Versorgung des Organismus zu gewährleisten. Spezialisierten Strukturen wie den Bypasselementen lassen sich mehrere Funktionen zuschreiben. Ihre Funktion in der Minderung von Druckspitzen in fein verzweigten Bereichen des Kanalsystems beispielsweise ist vermutlich eine Voraussetzung für die ausgeprägten Körperkontraktionen, die ansonsten mit dem gegebenen Aufbau des Wasserleitungssystems nicht in derselben Geschwindigkeit stattfinden könnten. Ohne den Transport größerer Mengen an frischem sauerstoffgesättigtem Wasser durch die Bypasselemente in Bereiche des ausführenden Wasserleitungssystems müsste die Architektur des gesamten Wasserleitungssystems eventuell in kleinere einzelne Bereiche aufgebrochen werden, die über mehrere Ein- und Ausstromöffnungen für jedes einzelne der Subsysteme verfügt. Die Untersuchungen der zellulären Strukturen des Wasserleitungssystems geben Hinweise darauf, dass in Schwämmen eine Reihe von Elementen im Wasserleitungssystem vorhanden sind, die eine feine Abstimmung der Strömungsverhältnisse in einzelnen Bereichen des Kanalsystems ermöglichen. Unter

morphologischen Gesichtspunkten gibt es Hinweise, dass das Wasserleitungssystem nicht nur aus physikalischer Sicht ein interessantes dynamisches System darstellt, sondern einer permanenten dynamischen Umbildung unterworfen ist, die eventuell auf eine Anpassung der Kanäle an veränderte Strömungsverhältnisse in der Umgebung des Schwamms zurückzuführen sind. Diese Prozesse sind jedoch, ebenso wie die Entstehung des Kanalsystems in der Entwicklung der Schwämme, bisher kaum verstanden. Die Entwicklung des Wasserleitungssystems *de novo* kann im Verlauf der Knospenentwicklung in Abhängigkeit der Entwicklung der weiteren anatomischen Strukturen untersucht werden.

### **Knospenbildung in *Tethya wilhelma***

Die Untersuchungen zur Entwicklungsdauer von Knospen in *T. wilhelma* ergaben sehr kurze Entwicklungszeiträume. Im Durchschnitt dauerte der makroskopisch beobachtbare Prozess der Knospenbildung rund 71 h. Damit weist *T. wilhelma* im Vergleich zu anderen *Tethya* Arten, wie *T. lynchurium*, *T. aurantium* (PALLAS, 1766) und *T. citrina* SARÀ & MELONE, 1965, für die eine Entwicklungsdauer von Wochen bis Monaten berichtet wird, einen relativ kurzen Zeitraum der Knospenentwicklung auf (Connes 1967, 1968; Corriero et al. 1996; Gaino et al. 2006).

Die frühen Knospenstadien, bevor die sich bildenden Knospen an der Spitze eines Stiels aus der Schwammoberfläche heraustreten, sind makroskopisch nur schwer zu identifizieren. Daher wurde der Knospungsprozess in Zeitrafferaufnahmen zunächst zurückverfolgt, um die frühesten Knospenstadien zu identifizieren, wie schon von Maas (1901) vorgeschlagen. In *T. wilhelma* werden diese als dichtere Bereiche im Cortex, in denen sich Zellen ansammeln, und später leicht hervor wölben, sichtbar (Abbildung 18B). Dies deckt sich mit den detaillierten Beobachtungen zur zellulären Zusammensetzung solch früher Knospenstadien, die an *T. lynchurium* gemacht wurden (Maas 1901). Auch in *T. maza* SELENKA, 1879 wurden vergleichbare Stadien der sich entwickelnden Knospen beobachtet (Selenka 1879). Ein vergleichbares Knospenstadium wurde als Stadium 1-Knospe für *T. seychellensis* (WRIGHT, 1881) beschrieben (Gaino et al. 2009). In *T. wilhelma* kann die Ausbildung dieses Stadiums bis zu 48 h in Anspruch nehmen. Im weiteren Verlauf der Knospenentwicklung konnten charakteristische Veränderungen beobachtet werden, die eine Unterteilung in verschiedene Stadien ermöglichten. Zunächst zeigte sich eine auf einem Stiel von der Oberfläche des Mutterschwammes abgehobene birnenförmige Knospe, in deren weiteren Entwicklung äußerlich Sklerenbündel sichtbar wurden, die zu einer abgeflachten sternförmigen Erscheinung der Knospen führten (Abbildung 18C-F). In späten Stadien wiesen die Knospen eine annähernd sphärische Form auf und es konnte eine eindeutige Differenzierung von Cortex und Choanoderm beobachtet werden, die aufgrund der unterschiedlichen Zelldichte in den beiden Bereichen deutlich zu erkennen war (Abbildung 18G). Dies deckt sich mit Beobachtungen der Knospenentwicklung in *T. maza*, *T. lynchurium* und *T. seychellensis* (Selenka 1879; Maas 1901; Connes 1967, 1968; Gaino et al. 2009).

Knospen, die kurz vor der Ablösung vom Mutterschwamm stehen, bilden teilweise extrem lange Körperausläufer, mit denen sie Kontakt zum Substrat herstellen und sich an diesem anheften. Dieses wurde ebenfalls für Knospen von *T. peracuta* (TOPSENT, 1918) und *T. tenuisclera* SARÀ & CORRIERO, 1994 berichtet (Sarà et al. 1993; Sarà 1994). Wie in *T. peracuta*, konnten auch bei *T. wilhelma* juvenile Schwämme beobachtet werden, die in direkter Nachbarschaft zum Mutterschwamm am Substrat angeheftet und weiterhin mit diesem verbunden sind. Dies wurde bisher nur für *Tethya*-Arten, die in Riff- und Lagunen-Habitaten vorkommen, beschrieben. Ein Vorkommen in derartigen Habitaten wurde auch für

*T. wilhelma* vermutet und wird durch diese Beobachtungen unterstützt (Sarà *et al.* 2001; Nickel 2004). Es stellt wahrscheinlich eine Anpassung in der Fortpflanzungsstrategie dieser Arten an die speziellen Umweltbedingungen des Lagunen-Habitats dar. Durch das direkte Anheften der Knospen vor der Ablösung vom Mutterschwamm wird ein Verdriften der abgelösten Knospen in weniger geeignete Habitate verhindert.

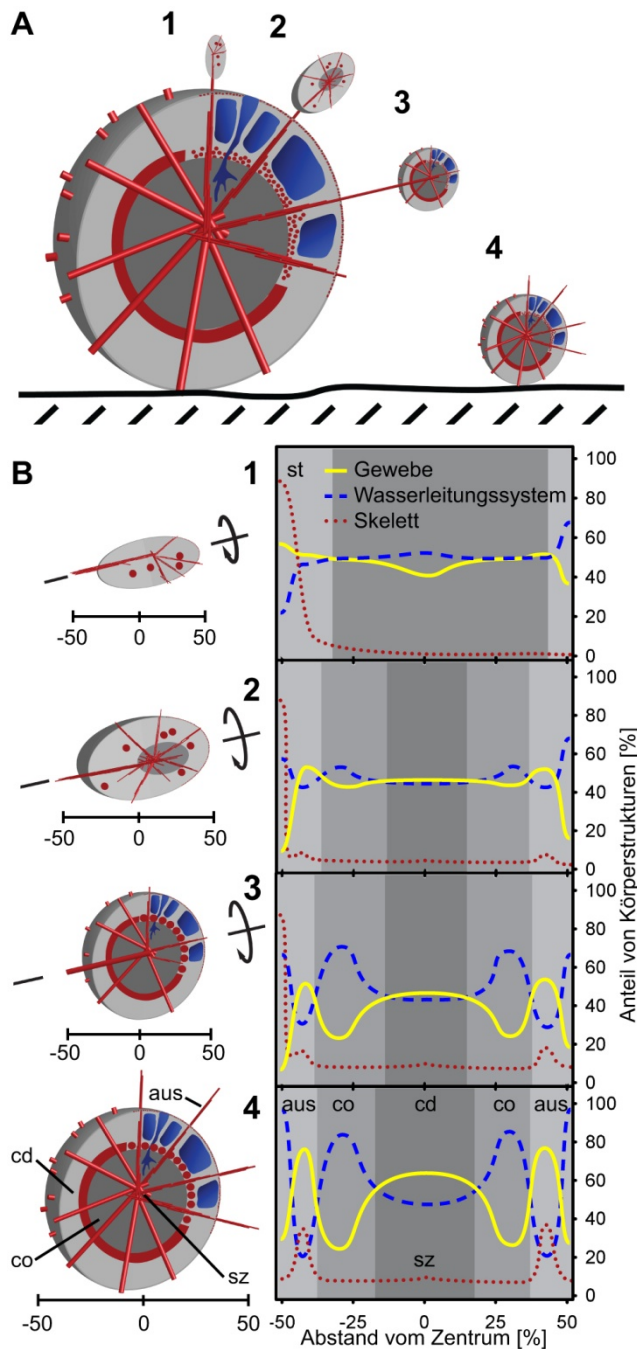
### **Räumlich-zeitliche morphologische Musterbildung in der Knospenentwicklung von *Tethya wilhelma***

Die Morphogenese, die sich im Verlauf der Knospenentwicklung in *T. wilhelma* abspielt, durchläuft eine räumlich-zeitliche Reihe von vier eindeutigen Knospenstadien. Asexuelle Entwicklungsprozesse in Schwämmen unterliegen somit räumlich-zeitlichen Mustern und sind vergleichbar mit der Knospung in Cnidariern (z. B. Clarkson & Wolpert 1967; Fischer & Hofmann 2004). Untersuchungen des Knospungsprozesses in Schwämmen können damit auch in einem allgemeineren Kontext Informationen zu Fragestellungen der evolutionären Entwicklungsbiologie der asexuellen Vermehrung und deren Regulation in Metazoen beitragen.

Unter der Annahme, dass die Entwicklung kontinuierlich verläuft, stellen die in der Knospenentwicklung von *T. wilhelma* definierten Stadien wichtige Marken in der Knospen-Morphogenese dar. In Abbildung 48 sind die morphologischen Veränderungen schematisch zusammengefasst. Zu Beginn der Knospung wandern weitgehend undifferenzierte Zellen ein, die auch die ersten Skleren in die entstehende Knospe transportieren. Dies wurde hier nicht im Detail untersucht. Studien in verschiedenen Schwammarten, darunter auch *T. wilhelma*, konnten die hohe Mobilität von Zellen und den Transport von Skelettelementen in Körperausläufern zeigen (Bond & Harris 1988, 1992; Nickel & Brümmer 2004). Stadium 1-Knospen werden vom Stiel, der sie mit dem Mutterschwamm verbindet und eine erste Symmetrieachse darstellt (Abbildung 48B1, Anhang 1 Film 3), dominiert. Zellen wandern aus dem Mutterschwamm in die sich bildende Knospe und ordnen sich achsensymmetrisch um die Spitze des Stiels, um eine kleine charakteristische, leicht birnenförmige Verdickung zu bilden (Abbildung 18C). Das zukünftige Zentrum des Schwammskeletts bildet sich im Mittelpunkt dieser kleinen Verdickung (Abbildung 48B2). Das gesamte räumlich-zeitliche Muster der morphologischen Veränderungen während der Knospenentwicklung ist charakterisiert durch eine Reihe zeitlich überlappender Prozesse: 1. Umordnung der Megaskleren aus der primären Achse über eine ebene sternförmige zu einer sphärischen sternförmigen Anordnung. 2. Ausbildung des Wasserleitungssystems, bestehend aus der Choanozytenkammerdifferenzierung (siehe Abbildung 19) und der Kanalbildung. 3. Entwicklung eines Choanosoms im Zentrum und einer Cortexregion, die nicht vor der Umbildung des Skeletts aus der ebenen Sternförmigen in die sphärische Sternform einzusetzen scheint (Abbildung 48B3-4, siehe auch Abbildung 21B-C und Abbildung 25B-C). Dieser Vorgang fällt zumeist mit der Freisetzung der Knospe vom Mutterschwamm zusammen.

Die Skelettentwicklung scheint daher einer der Schlüsselvorgänge in der Knospenentwicklung zu sein. Ein wichtiger Hinweis dafür sind nicht nur die Beobachtungen, dass die ersten eindeutig nachvollziehbaren Veränderungen von räumlich-zeitlichen Mustern in der Knospenentwicklung sich in der Entwicklung der Skelettelemente zeigen, sondern auch die weitreichenden Konsequenzen die sich daraus ergeben. Die Skelettentwicklung definiert





**Abbildung 48: Schema der Knospenentwicklung von *T. wilhelma*.** (A) Es treten vier charakteristische Knospenstadien auf, von denen die ersten drei mit dem Mutterschwamm über einen Stiel verbunden sind: Skelettelemente in rot (Megasklerenbündel und Astersphäre); Megasklerenbündel sind teilweise als Zylinder vereinfacht dargestellt; Gewebe in grau, unterteilt in Cortex (hellgrau) und Choanoderm (dunkelgrau). (B) Details der Knospenstadien (links) und schematische Diagramme der Verteilung von funktionellen morphologischen Einheiten (rechts). In den Stadien 1-3 besteht annäherungsweise eine Achsensymmetrie entlang des verbindenden Stiels (st) (vgl. Anhang 1 Film 3). Stadium 4-Knospen zeigen einen dem Adultus vergleichbaren Körperbau mit Punktsymmetrie zum Skelettzentrum (sz; siehe auch Anhang 1 Film 4). Die Entwicklung des Choanoderms beginnt im Stadium 2 und wird von der Ausbildung der Megastersphäre in Stadium 3 begleitet. Die Differenzierung in Cortex (co) und Choanoderm (cd) ist charakterisiert durch die Entwicklung des Wasserleitungssystems (größere Kanäle in Stadium 2, Lakunen in Stadium 3). Ausgeprägte Körperausläufer (aus) sind ab Stadium 4 vorzufinden (modifiziert nach Hammel *et al.* 2009).

nicht nur das zukünftige Schwammzentrum, sondern scheint auch indirekt Einfluss auf die Differenzierung von Choanoderm und Cortex zu haben. Wie die Untersuchungen der Architektur des Wasserleitungssystems gezeigt haben, wirkt sich die Anordnung der Skelettelemente auch auf die Topologie des Wasserleitungssystems aus. Um die Skelettentwicklung als leitenden Prozess in der Knospenentwicklung eindeutig zu identifizieren, wird es nötig sein die Transportprozesse von Skleren in die Knospen und die Neusynthese von Skleren in Knospen detailliert zu untersuchen.

Alle in der Knospenentwicklung involvierten Vorgänge scheinen in den abgelösten Jungschwämmen abgeschlossen zu sein. Abgesehen von einer allgemeinen Größenzunahme, die auf der Spiculasynthese, Zellteilung und Differenzierung und der extrazellulären Matrix Synthese beruht, finden keine weiteren morphologischen

Veränderungen statt. Unter strukturellen Gesichtspunkten ist ein Gleichgewichtszustand erreicht, was unterstreicht, dass die Knospen einen dem Adultus vergleichbaren Körperbau ausgebildet haben. Ab diesem Zeitpunkt gewinnen die Jungschwämme nur noch an Größe. Hierbei kann es zu einer bedeutenden Volumenzunahme von bis zu 7500x oder darüber kommen. Größere adulte Exemplare von *T. wilhelma* mit einem Durchmesser von rund 2 cm weisen typischerweise ein Volumen von ca. 4,2 cm<sup>3</sup> auf. Daher kann angenommen werden, dass die Knospen im Stadium 4 einen Zustand der „konstanten Morphogenese“ erreicht haben (Ereskovsky 2003); d.h. im Rahmen der Größenzunahme findet eine fortlaufende Zellteilung und –differenzierung statt.

### Funktionalität des Wasserleitungssystems freigesetzter Knospen

Die Funktionalität und Eigenständigkeit der Jungschwämme ist eng mit der Anwesenheit eines funktionalen Kanalsystems verbunden. Erst mit dem Einsetzen der eigenständigen Pumpaktivität sind die Jungschwämme in der Lage, Nahrungspartikel aus der Umgebung einzustrudeln und aufzunehmen. Neben der Bildung von Kanälen ist die Differenzierung von Choanozyten ein Schlüsselement in diesem Prozess. Bisher konnte die Anwesenheit von Choanozytenkammern in Knospen nur für fünf weitere Schwammarten gezeigt werden: *M. contarenii*, *Tethya seychellensis* (WRIGHT, 1881), *Oscarella lobularis* (SCHMIDT, 1862), *O. tuberculata* (SCHMIDT, 1868) und den Süßwasserschwamm *R. cerebellata* (De Vos 1965; Saller 1990; Corriero & Scalera Liaci 1998; Ereskovsky & Tokina 2007; Gaino et al. 2009). Die Beobachtungen zur Choanozytenkammerentwicklung in Knospen von *T. wilhelma*, die in frühen Stadien dicht gepackte Choanozyten zeigen, welche in späteren Stadien die Choanozytenkammern formen (Abbildung 30A, F), decken sich mit den Ergebnissen von Stadium 2- und Stadium 3-Knospen in *T. seychellensis* (Gaino et al. 2009). Ultrastrukturelle Untersuchungen in *T. seychellensis* gaben Hinweise darauf, dass sich die Choanozytenkammern in diesen eventuell in Stadium 2-Knospen zu bilden beginnen, indem Choanozyten die Hohlräume auskleiden, die sich in der Kollagenmatrix bilden (Gaino et al. 2009). Im Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis* (LINNAEUS, 1759) gelang es, die Differenzierung von Choanozyten aus Archaeozyten und die Bildung von Choanozytenkammern anhand von genetischen Markern im Verlauf der Auskeimung von Gemmulae zu verfolgen (Funayama et al. 2005; Funayama et al. 2010). Mithilfe dieser genetischen Marker könnte auch die Differenzierung von Choanozyten in der Knospenentwicklung von *T. wilhelma* untersucht werden und somit zur Klärung der bisher noch unbeantworteten Frage der Entwicklung von Choanozytenkammern im Bezug auf die Kanalentwicklung beitragen.

Zur Bildung der Kanäle und Lakunen in Knospen gibt es keine weiteren morphologischen Untersuchungen. In *T. wilhelma*-Knospen waren sich bildende Kanäle unregelmäßig zu beobachten. Bei einigen Exemplaren waren diese bereits deutlich erkennbar, während Choanozyten noch in kleinen Gruppen dicht gepackt im Mesohyl in größerer Entfernung zu dem sich bildenden Kanal vorzufinden waren (Abbildung 30B). In anderen Knospen hingegen konnten relativ weit entwickelte Choanozytenkammern gefunden werden, jedoch waren keine Kanäle nachweisbar. An Kanäle angeschlossene Choanozytenkammern in späten Knospenstadien wiesen den für *T. wilhelma* typischen Aufbau der Choanozytenkammern mit monocillierten Konuszellen und siebartigen Zellen in der Prosopyle auf (Abbildung 30F, vgl. Abbildung 34). Unter morphologischen Gesichtspunkten besitzen die Knospen zu diesem Zeitpunkt ein funktionsfähiges Wasserleitungssystem. Für Knospen des Süßwasserschwammes *R. cerebellata* berichtet Saller (1990), dass diese bereits im Laufe ihrer Entwicklung, während sie noch mit dem Mutterschwamm verbunden sind, bereits selbstständig und kontinuierlich Wasser pumpen.

## Funktionalität der freigesetzten Knospen

Um die Funktionsfähigkeit des Wasserleitungssystems und die Fähigkeit zur eigenständigen Nahrungsaufnahme von *T. wilhelma*-Knospen zu prüfen, wurden Jungschwämme mit Bäckerhefe gefüttert. Die Hefen waren anschließend überall im Wasserleitungssystem nachweisbar und wurden sowohl von Choanozyten wie auch von Endopinacozyten des Kanalsystems phagozytiert (Abbildung 29). Vergleichbare Ergebnisse ergaben Untersuchungen an den Süßwasserschwämmen *E. fluviatilis* und *Spongilla fragilis* LEIDY, 1851<sup>7</sup>, sowie in *Reniera cinerea* (Grant, 1826)<sup>8</sup> (Weissenfels 1983; Langenbruch 1985). In beiden Arten wurden die Hefezellen bevorzugt von Choanozyten, aber auch von Endopinacozyten, aufgenommen. Da die Hefezellen von den Schwämmen nicht verdaut werden können, sind diese bis zu zwei Tage nach ihrer Aufnahme nachweisbar. Über diesen Zeitraum werden sie durch Exozytose in das ausführende Kanalsystem wieder ausgeschieden (Weissenfels 1983).

Ein charakteristisches Merkmal adulter Individuen von *T. wilhelma* sind ausgeprägte Körperkontraktionen (Nickel 2004). Für abgelöste Knospen von *T. wilhelma* konnten diese ebenfalls anhand von Zeitrafferaufnahmen eindeutig nachgewiesen werden. Diese zeigen auch, wie in adulten Individuen, eine für jede Knospe individuelle, und über lange Zeit gesehen variable, Rhythmik (Nickel 2004). Die Kinetik der Kontraktion in Knospen mit einer maximalen Geschwindigkeit in der Kontraktionsphase von  $0,039 \text{ min}^{-1}$  und  $0,019 \text{ min}^{-1}$  in der Expansionsphase liegen damit im Bereich der für adulte Individuen beobachteten und beschriebenen Werte (Abbildung 28, vgl. Nickel 2004; Ellwanger et al. 2007).

Die abgelösten Knospen können somit als vollständig funktionsfähige und eigenständige Jungschwämme angesehen werden, die sich von adulten Exemplaren nur noch in ihrer Größe unterscheiden. Diese können damit als funktionelle Vertreter für morphologische, physiologische und genetische Untersuchungen dienen. Da sie in der Lage sind selbstständig Nahrung aufzunehmen, können sie auch in den Experimenten zur Genregulation, vermittelt durch dsRNA-exprimierende Bakterien, eingesetzt werden.

## Knospenbildung in anderen Schwämmen

Asexuelle Vermehrungsvorgänge in Demospongien wurden schon zuvor untersucht, speziell die Knospung in *Tethya maza* SELENKA, 1879 von Selenka selbst (Selenka 1879) und in *Tethya lyncurium* (PALLAS, 1766)<sup>9</sup> von Maas und Connes (Maas 1901; Connes 1967, 1968). In dieser Art stammen, wie in *T. wilhelma*, die ersten Megaskleren aus dem Mutterschwamm und bilden das ursprüngliche Zentrum der neuen Knospe. Früh in der Entwicklung der entstehenden Knospe beginnt ebenfalls die Synthese von neuen Spicula. In frühen Knospen wird eine fächerförmige Anordnung des Skeletts beschrieben, die sich später zu einer radiären sternförmigen Architektur, wie auch in *T. wilhelma*, verändert. Als Erster unterschied Maas verschiedene Stadien in der Knospenentwicklung. Sein „Fächerförmiges Stadium“ von *T. lyncurium* weist vermutlich denselben Entwicklungsstand wie Stadium 1-Knospen von *T. wilhelma* auf. Eine vergleichbare Stadium 1-Knospe wurde von Sollas in *Tethya seychellensis* (WRIGHT, 1881) dokumentiert (Sollas 1888). In *T. lyncurium* findet die Bildung

<sup>7</sup> Akzeptiert als *Eunapius fragilis* (Leidy, 1851).

<sup>8</sup> Akzeptiert als *Haliclona (Reniera) cinerea* (Grant, 1826).

<sup>9</sup> Anmerkung: *T. lyncurium* ist ein nicht akzeptiertes Junior Synonym von *T. aurantium* (PALLAS, 1766); Unter Umständen haben einer oder beide Autoren an *T. citrina* SARÀ & MELONE 1965 gearbeitet, welche als eine kryptische Art zuvor ebenfalls als *T. aurantium*/*T. lyncurium* beschrieben wurde.

von größeren eindeutigen Sklerenbündel und deren radial sternförmige Anordnung typischerweise erst nach der Freisetzung der Knospen vom Mutterschwamm statt. Im Gegensatz dazu findet sich eine vergleichbare Organisationsstufe in Stadium 3-Knospen von *T. wilhelma*, die immer noch mit dem Mutterschwamm verbunden sind. Für Knospen die kurz vor der Ablösung stehen, beobachtete Maas den Beginn der Aufspaltung in Choanoderm und Cortex. Dies deckt sich mit der Definition einer Stadium 2-Knospe in der vorliegenden Arbeit. Im direkten Vergleich entwickeln sich bestimmte morphologische Merkmale in *T. wilhelma* früher als in *T. lyncurium*. Die Befunde von Maas werden durch die Arbeiten von Connes unterstützt der anmerkt, dass die Knospen bei Ablösung unterscheidbare Regionen aufweisen, die dem Choanoderm und Cortex der Adulti entsprechen, aber sich auf mikromorphologischer Ebene noch unterscheiden (Connes 1967, 1968). Neu abgelöste Knospen weisen beispielsweise keine Lakunen, Kanäle und Choanozytenkammern auf. In beiden Untersuchungen konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob sich Choanozytenkammern oder Kanäle zuerst bilden. Im Gegensatz zu *T. wilhelma*, bei der voll funktionsfähige Knospen innerhalb eines kurzen Entwicklungszeitraums von nur rund drei Tagen freigesetzt werden (Abbildung 18), dauert die Entwicklung der Knospen bei *T. lyncurium* Wochen bis Monate. Ähnliche Beobachtungen werden auch für *T. aurantium* und *T. citrina* berichtet (Corriero *et al.* 1996; Gaino *et al.* 2006). Knospen werden hier ohne funktionelles Wasserleitungssystem freigesetzt und entsprechen den Stadien 2 und 3 in *T. wilhelma*. Für die frühen Knospentstadien beschreiben die Autoren ebenfalls dicht gepackte Zellen und vermuten eine wichtige Rolle des Skeletts in der Knospenentwicklung. In allen Fällen ist die Größe der Knospen kein hinreichender Hinweis auf den Entwicklungszustand der neu gebildeten Knospen.

In *Axinella damicornis* (Esper, 1794) werden die externen Knospen aus dem Ektosom gebildet und weisen eine diesem ähnliche zelluläre Zusammensetzung auf (Boury-Esnault 1970). Dies ist vergleichbar mit *T. aurantium* und *T. citrina*. Zusätzlich teilen alle drei Arten das Fehlen eines Wasserleitungssystems der freigesetzten Knospen. Jedoch weisen die Knospen von *A. damicornis* keine Skelettelemente auf. Die Entwicklungsreihe der Knospen dieser Art sollten in Zukunft genauer untersucht werden.

Knospen von *T. maza* besitzen im Gegensatz dazu Choanozytenkammern und Kanäle im sich entwickelnden Choanosom (Selenka 1879). Weiterhin entwickelt sich das cortikale System von Lakunen bereits vor der Freisetzung der Knospen vom Mutterschwamm. Jedoch sind die Lakunen und das Wasserleitungssystem des sich entwickelnden Choanosoms zu diesem Zeitpunkt noch nicht miteinander verbunden. Diese Knospen in *T. maza* scheinen mit Stadium 3-Knospen in *T. wilhelma* vergleichbar zu sein. Abgesehen von *T. maza* und *T. wilhelma* wurde die Freisetzung von vollständig funktionalen Knospen nur für *M. contarenii*, *T. seychellensis*, *O. lobularis*, *O. tuberculata* und den Süßwasserschwamm *R. cerebellata* berichtet (De Vos 1965; Saller 1990; Corriero & Scalera Liaci 1998; Ereskovsky & Tokina 2007; Gaino *et al.* 2009).

In *M. contarenii* findet sich ein gut entwickeltes Wasserleitungssystem in den neu freigesetzten Knospen. In jungen Knospen sind die Zellen gleichmäßig verteilt, in einigen Fällen auch enger in einer etwas dichteren Anordnung gruppiert, in anderen Fällen eher locker gepackt. In der fortschreitenden Entwicklung finden Choanozyten zusammen um, Kammern entlang der Kanäle zu bilden. Dieser Vorgang wird begleitet von der Lakunenbildung und Abspaltung des Choanosoms. Daher können die freigesetzten Knospen von *M. contarenii* mit Stadium 4-Knospen von *T. wilhelma* verglichen werden. Die in *T. seychellensis* als Stadium 3 beschriebenen Knospen, die bereits vollständig funktionsfähige Choanozytenkammern besitzen, scheinen mit den Stadium 4-Knospen von

*T. wilhelma* vergleichbar zu sein. In allen untersuchten Demospongien konnten eindeutige Muster in der Knospenbildung beobachtet werden. Diese umfassen: 1. Die charakteristischen Umbildungen und Anordnung der Skelettelemente, 2. Die Differenzierung der Choanosom- und Cortexbereiche und 3. Die Bildung und Differenzierung von Elementen des Wasserleitungssystems. Wenn man diese Muster unter den verschiedenen Arten vergleicht, so zeigen sich charakteristische Muster, die in allen Arten auftreten, und sich nur im Zeitpunkt und Reihenfolge in der Entwicklung unterscheiden (Heterochronie).

### **Folgt die Knospenbildung in Schwämmen allgemeinen charakteristischen räumlichen-zeitlichen Mustern?**

Die vorliegenden Untersuchungen werfen die Frage auf, ob die beobachtete Reihe von morphologischen Veränderungen nur spezifisch auf *T. wilhelma* zutrifft, oder allgemein in Schwämmen auftritt. Das bemerkenswerte Maß an Variabilität im Knospungsprozess von Schwämmen, bezogen auf den Zeitraum der Entwicklung und Differenzierung des Körperbaus und den Entwicklungszustand, der bei Freisetzung erreicht wird, ist ein Zeichen für allgemeine Heterochronie. Die Knospenentwicklung im Ganzen kann sich von 24 h (*R. cerebellata*) bis hin zu mehreren Monaten (*T. lyncurium*) erstrecken (Connes 1967; Saller 1990), wobei auch die Zeit zwischen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien ebenfalls stark variiert. Einige Arten entlassen ihre Knospen als vollständig funktionsfähige Individuen (Saller 1990; Corriero & Scalera Liaci 1998) entsprechend den Stadium 4-Knospen von *T. wilhelma*, andere im Gegensatz dazu entlassen Knospen die eine parenchymale Organisation aufweisen (Connes 1967; Gaino *et al.* 2006). Diese ähneln der Gewebeorganisation von Parenchymulalarven. Die entsprechenden Knospen besitzen zum Zeitpunkt ihrer Ablösung keine funktionalen Elemente des Wasserleitungssystems wie Choanozytenkammern oder Kanäle und beginnen die abschließende Phase ihrer Entwicklung und Differenzierung, nachdem sie sich am Substrat festgesetzt haben (Ereskovsky & Tokina 2007). Ihr Organisationsniveau zum Zeitpunkt der Ablösung ist mit Stadium 2-Knospen von *T. wilhelma* vergleichbar. Abgesehen von Heterochronieeffekten zeigte die erneute Auswertung der publizierten Daten ähnliche räumlich-zeitliche Muster für alle *Tethya*-Arten (Maas 1901; Connes 1967), *Mycale*-Arten (Corriero & Scalera Liaci 1998), *R. cerebellata* (Saller 1990) und sogar die Homoscleromorpha (Ereskovsky & Tokina 2007). Dies zeigt, dass räumlich-zeitliche Reihen morphologischer Muster ein allgemeines Phänomen in der asexuellen Vermehrung von Schwämmen sind. Aus den vorliegenden Daten und publizierten Beispielen kann geschlossen werden, dass die höchst organisierte Morphologie in Schwämmen in den späten Knospen/ jungen juvenilen Schwämmen (abgelöst) auftritt. In einigen Schwämmen, z. B. *R. cerebellata*, scheint die allgemeine Körpermorphologie in Knospen sogar höher organisiert zu sei als in späteren adult Stadien (vergleiche hierzu Abbildung 2 in Saller 1990).

### **Morphogenetische Vorgänge im Verlauf der asexuellen Vermehrung**

Die Entwicklung der Knospen von den frühesten zu komplexen Knospenstadien erfordert, zumindest für einen bestimmten Zeitraum, die Differenzierung und eine Reihe von bestimmten und gerichteten Zellbewegungen, z. B. die spezifische Anordnung der Spicula mittels spezialisierter Zellen wie den Sklerozyten. Solche räumlich-zeitlich bestimmten morphogenetischen Vorgänge sind vergleichbar mit den morphogenetischen Zellbewegungen während der Embryonal- und Larvenentwicklung in Eumetazoen. In verschiedenen Stämmen beispielsweise ist die Gastrulation charakterisiert durch Ingression und Einwanderung von Zellen, die zu bestimmten morphologischen Mustern führt (Tardent

1978). Auf einer vergleichbaren biomechanischen Weise ist die Knospung in Schwämmen charakterisiert durch die Ingression und Einwanderung von unabhängigen mesenchymalen Zellen aus dem Mutterschwamm. Dies wird auch als mesenchymale Morphogenese beschrieben und unterscheidet sich von der epithelialen Morphogenese, die in der Knospenbildung von Cnidariern und auch in Homoscleromorphen Schwämmen vorzufinden ist (Ereskovsky & Tokina 2007; Ereskovsky et al. 2009). Jedoch spielen Pinacoderm Ausstülpungen, zumindest in den sehr frühen Phasen der Knospenbildung, auch in der durch mesenchymale Morphogenese bestimmten Knospenbildung eine Rolle.

### **Morphogenetische Vorgänge in der Entwicklung von Metazoen**

Morphogenetische Prozesse in Metazoen werden allgemein von Entwicklungsgenen gesteuert. Die Ergebnisse neuerer Genomsequenzierprojekte haben gezeigt, dass Schwämme eine Reihe von Entwicklungsgenen besitzen, die damit als ubiquitär für die Metazoa gelten können (Martindale 2005; Larroux et al. 2006; Adamska et al. 2007; Lapébie et al. 2009). Die große Herausforderung für Evolutionsbiologen besteht nun darin zu verstehen, wie die Diversifikation der Entwicklungsgenfamilien zu der Ausbildung der großen Zahl an Merkmalen wie Symmetrieachsen, Keimblätter, Körperhöhlen, Skelett- und Nervensystem geführt haben, die für die Baupläne der unterschiedlichen Stämme charakteristisch sind. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang Vertreter der *Hox*- und *Wnt*-Genfamilie, die an der Ausbildung der primären Körperachse in allen Metazoen beteiligt sind (Ryan & Baxeavanis 2007). Die Mitglieder der *Wnt*-Genfamilie beispielsweise haben im Verlauf der Evolution eine erstaunliche Diversifikation erfahren. Im Genom von Cnidariern konnten 12 der 13 bekannten Unterfamilien dieser Genfamilie nachgewiesen werden, wohingegen im Genom des Choanoflagellaten *M. brevicollis* kein einziger Vertreter zu finden ist (Kusserow et al. 2005; King et al. 2008). Die *Wnt*-Gene stellen vermutlich den evolutiv gesehen ältesten Mechanismus zur Ausbildung der primären Körperachse dar und sind durch ihre Diversifikation maßgeblich an der Evolution der zunehmenden Komplexität der Baupläne beteiligt (Ryan & Baxeavanis 2007). Um unser Verständnis dieser Vorgänge zu erweitern sind neben vergleichenden bioinformatischen Untersuchungen vor allem Studien zu Expressionsmustern im räumlich-zeitlichen Kontext der Entwicklung und funktionelle Untersuchungen der einzelnen Entwicklungsgene von Nöten. Hier können vor allem die basalen Vertreter der Metazoa: Porifera, Ctenophora, Placozoa und Cnidaria aufgrund ihrer geringeren Komplexität einen wichtigen Beitrag leisten. Anhand von *In Situ*-Hybridisierungen konnten beispielsweise die Rolle von komplementär exprimierten Mitglieder der *Wnt*-Genfamilie in der Ausbildung der axialen Pole in Embryonen von Cnidariern (Kusserow et al. 2005; Lee et al. 2006) und auch in Larven von *Amphimedon queenslandica* HOOPER & VAN SOEST, 2006 (alias *Reniera* sp.) gezeigt werden (Adamska et al. 2007). Es sind vor allem die komplexen komplementären Expressionsmuster, die zu einer Diversifikation der beobachteten Merkmale führen. Daher werden vor allem funktionelle vergleichende Untersuchungen benötigt, in denen beispielsweise eines der exprimierten Gene ausgeschaltet wird, um die genaue Funktion dieses Gens in den Entwicklungsvorgängen und seine Beziehungen und Wechselwirkungen mit anderen Entwicklungsgenen und Transkriptionsfaktoren zu verstehen. Nur durch eine integrative Betrachtung von morphologischen, bioinformatischen und entwicklungsgenetischen Ergebnissen können wir beginnen zu verstehen, welche Veränderungen in der Ontogenese zu der enormen Diversifikation morphologischer Merkmale in den Metazoen geführt hat.

Wie für Cnidarier gezeigt wurde, sind grundlegende genetische Regulationsvorgänge die in der Larvenentwicklung involviert sind, nicht auf diese beschränkt, sondern auch an der Steuerung der asexuellen Vermehrung beteiligt. In *Hydra* beispielsweise spielt *HyWnt* eine zentrale Rolle in der Bildung und Erhaltung der Kopforganisation und der Achsen-Bildung in Knospen (Hobmayer *et al.* 2000). Ähnliche Effekte wurden kürzlich in adulten Schwämmen gezeigt, bei denen *Wnt* in die Bildung von Ostia involviert ist (Lapébie *et al.* 2009). Es ist wahrscheinlich, dass zukünftige Untersuchungen eine Bedeutung von *Wnt* auch in der morphologischen Musterbildung im Verlauf der Knospenentwicklung in Schwämmen zeigen werden. Dies bleibt jedoch bis zur experimentellen Bestätigung nur eine Vermutung. Sollte sich dies jedoch bestätigen, könnten Knospen von *T. wilhelma* aufgrund der einfachen und kontinuierlichen Verfügbarkeit in Kombination mit der in der vorliegenden Arbeit etablierten Technik zur fütterungsinduzierten RNA-Interferenz, die eine Inhibierung einzelner Entwicklungsgene ermöglicht, dazu beitragen die Regulation der räumlich-zeitlichen Musterbildung in der asexuellen Vermehrung besser zu verstehen. Die Möglichkeit vergleichende funktionelle Untersuchungen von Entwicklungsgenen in Knospen anzufertigen könnte vergleichbare Analysen zur Larvenentwicklung aus sexueller Vermehrung anhand von Expressionsmustern (Larroux *et al.* 2006; Adamska *et al.* 2007) um funktionelle Aspekte der Entwicklungsgene ergänzen.

### **Fütterungsinduzierte RNA-Interferenz in *Tethya wilhelma***

Um Untersuchungen zu den zuvor genannten Fragestellungen im Kontext der evolutionären Entwicklungsbiologie basaler Metazoen, wie auch an weiteren genregulatorischen Netzwerken z. B. physiologischer Vorgänge in Schwämmen zu ermöglichen, wurde ein Protokoll für die fütterungsinduzierte RNA-Interferenz in *T. wilhelma* etabliert. Dieser Ansatz wurde gewählt, da er die für die Versuchstiere schonendste Technik zur Einschleusung der Antisens-RNA darstellt und damit eine Beeinträchtigung der Versuchstiere durch diesen Eingriff ausgeschlossen werden kann.

Für derartige Untersuchungen werden eine große Zahl von Individuen benötigt, um die entsprechenden Replikate und Kontrollen anfertigen zu können. Aufgrund des relativ langsamen Wachstums von Schwämmen sind adulte Individuen hierfür nur bedingt geeignet. Vielmehr wäre es vorteilhaft auf funktionale Jungschwämme zurückgreifen zu können. Wie die vorhergehenden morphologischen Analysen des Knospungsprozesses von *T. wilhelma* gezeigt haben, sind selbige bei dieser Art verfügbar. Die abgelösten Knospen stellen sowohl unter morphologischen und anatomischen, wie auch unter funktionellen Gesichtspunkten voll entwickelte Jungschwämme dar und sind wesentlich größeren Adulten funktionell äquivalent. Aufgrund der hohen Reproduktionsrate und kurzen Entwicklungsdauer stehen die Jungschwämme in großer Zahl für genetische Untersuchungen zur Verfügung (Anhang 1 Film 1). Die eigenständige Nahrungsaufnahme, die eine grundlegende Voraussetzung für die fütterungsinduzierte RNA-Interferenz darstellt, konnte anhand der Fütterungsexperimente mit Hefen belegt werden (Abschnitt 4.1.5).

Für die meisten Gene wird eine Reduktion der mRNA-Level unter einen kritischen Schwellenwert benötigt, um zu einem sichtbaren Phänotyp zu führen. Dies ist unter anderem von der Menge der eingeschleusten dsRNA abhängig. Daher wurde zunächst der Zeitraum eines Fütterungsintervalles bestimmt, in welchem es in Folge der Ingestion der dsRNA-exprimierenden Bakterien durch die Schwämme, zu einer Reduktion der mRNA-Level des Zielgens in den Schwämmen kommt. Ein Fütterungsintervall von 20 min, wie es in der standardmäßigen Kultivierung der Schwämme zum Einsatz kommt, hat sich als zu kurz

erwiesen. Wurden die Schwämme jedoch für 24 h in einer Bakteriensuspension inkubiert, konnte bereits nach 48 h eine Reduktion der untersuchten mRNA-Level beobachtet werden (Abbildung 42). Nach 72 h konnten die niedrigsten, und nach 116 h wieder leicht erhöhte, aber im Vergleich zur Kontrollgruppe dennoch erniedrigte, mRNA-Level nachgewiesen werden. Damit konnte zum einen gezeigt werden, dass über einen Zeitraum von 24 h eine ausreichende Menge von dsRNA in die Schwämme eingeschleust werden konnte, die zu einer Erniedrigung der endogenen mRNA-Level führten, sowie dass der beabsichtigte knock-down Effekt bereits nach 72 h zu beobachten ist und über mehrere Tage anhält. Der Anstieg der mRNA-Level nach 116 h im Vergleich zum vorhergehenden Messpunkt könnte sowohl auf eine natürliche Variabilität der Expressionsniveaus zwischen einzelnen Knospen, oder auf ein Abklingen des knock-down Effektes durch die eingeschleusten dsRNAs hinweisen. In weiteren Experimenten wurden die Schwämme daher täglich mit dsRNA-exprimierenden Bakterien gefüttert, um somit sicher zu stellen, dass kontinuierlich eine ausreichende Menge an dsRNA in den Schwammzellen vorhanden ist, die zu einer Erniedrigung der mRNA-Level führt. Weiterhin ist zu beachten, dass die mRNA-Niveaus in diesen Experimenten nur semi-quantitativ anhand von Agarose-Gelen bestimmt wurden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei der Amplifizierung im Verlauf der PCR bei einzelnen Proben zu einer Sättigung gekommen ist, da einer der Reaktionspartner im Reaktionsgemisch annähernd verbraucht war. Daher kam in weiteren Analysen die quantitative Real-Time-PCR zum Einsatz, die neben einer genaueren Quantifizierung auch eine Qualitätskontrolle der einzelnen Amplifikationen ermöglicht.

Ein kritischer Punkt im Verlauf der Amplifizierung und anschließenden relativen Quantifizierung sind neben der Qualität der eingesetzten RNA bzw. cDNA die verwendeten Primer. Da bisher für keine Schwammart ein annotiertes Genom verfügbar ist, konnte eine Kreuzreaktivität der eingesetzten Primer, die zu einer Amplifikation eines nicht gewünschten DNA-Fragmentes führt, nicht anhand von bioinformatischen Untersuchungen geklärt werden. Stattdessen wurden Schmelzkurvenanalysen der amplifizierten PCR-Fragmente erstellt. Diese wiesen für die jeweiligen PCR-Produkte nur ein Maximum auf (Abbildung 43A). Dies belegt, dass im Verlauf der Amplifikation nur ein einziges Fragment amplifiziert wird und es zu keiner Bindung der Primer an andere DNA-Abschnitte kommt. Anhand des bestimmten Schmelzpunktes kann zwar indirekt durch den Vergleich mit für das entsprechende Fragment berechneten Werten eine Aussage getroffen werden, ob es sich bei dem amplifizierten PCR-Produkt um das gewünschte Fragment handelt, jedoch ist dies nur ein indirekter Nachweis. Daher wurden die amplifizierten PCR-Produkte ebenfalls sequenziert. Hierbei ergaben sich keine Abweichungen von den erwarteten Sequenzen.

Für die relative Quantifizierung der mRNA-Level des Zielgens ist es wichtig ein Referenzgen zu verwenden, welches stabile Expressionsniveaus aufweist. Hierfür wurden klassischerweise vor allem Housekeeping-Gene oder Gene, die eine zentrale Rolle in wichtigen Stoffwechselwegen spielen, eingesetzt. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass für viele dieser oft prozessierte Pseudogene nachgewiesen werden können. Dies trifft beispielsweise auf die häufig verwendete Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) oder auf  $\beta$ -Aktin zu (Ercolani *et al.* 1988; Dirnhofer *et al.* 1995). Eine Evaluierung der Expressionslevel der gewählten Referenzgene ist unter allen Umständen unerlässlich, auch wenn sich diese in anderen Organismen bereits als geeignete Kandidaten herausgestellt haben (Pfaffl 2006). Für *T. wilhelma* wurden die Transaldolase (TALDO) aus dem Pentosephosphat Stoffwechselweg und ein Protein des S5-verwandten-Clusters (RPS5) der 40S ribosomalen Untereinheit als Referenzgen ausgewählt. Anhand mehrerer qRT-PCR Analysen dieser beiden Gene,



basierend auf cDNA die aus unterschiedlichen Jungschwämmen gewonnen wurde, wurden die Expressionslevel anhand der  $C_t$ -Werte im Verlauf der Real-Time-PCR bestimmt. Hierbei ergaben sich für das TALDO-Fragment im Mittel Werte von 24,9 die in den untersuchten Proben jedoch um bis zu drei Einheiten schwankten. Die Transaldolase wurde daher als Referenzgen verworfen. Für das RPS5-Fragment ergaben sich relativ stabile Expressionsniveaus, die nur um 0,1 Einheiten vom beobachteten Mittel bei 26,4 schwankten. Damit stellte sich dieses Fragment als geeignetes Referenzgen in *T. wilhelma* heraus.

Das in der Arbeit entwickelte Protokoll zur fütterungsinduzierten RNA-Interferenz in Schwämmen wurde anhand des Aktin-Gens in *T. wilhelma* getestet. Aktin wurde als Zielgen aus den zur Verfügung stehenden Gensequenzen ausgewählt, da aufgrund der Rolle von Aktin in einer Vielzahl zellulärer Prozesse deutliche Phänotypen erwartet wurden. Die Untersuchungen zur Erniedrigung der Aktin-mRNA-Level dienten als „Proof of Principle“ Experiment und sollten die Anwendbarkeit der RNA-Interferenz Technik in Schwämmen belegen. Die Einschleusung eines 703 bp langen dsRNA-Fragmentes des Aktin-Gens führte bereits nach 48 h zu einer deutlichen Reduzierung der endogenen Aktin-mRNA-Level. Diese konnten über den gesamten Zeitraum des Experimentes durch tägliche Fütterung mit dsRNA-exprimierenden Bakterien aufrecht erhalten werden. Die endogenen mRNA-Level konnten maximal auf rund 20 % des Ausgangsniveaus reduziert werden. Dies ist für ein hoch exprimiertes Gen ein sehr guter Wert, da ein vollständiges Ausschalten eines Zielgens mit der RNAi-Technik normalerweise nicht zu erreichen ist. Die im Verlauf des Experimentes beobachteten Erhöhungen der mRNA-Level nach 120 h und 168 h könnten auf individuelle Schwankungen in einzelnen Knospen zurückzuführen sein. Dieses Problem könnte in Zukunft eliminiert werden, indem für die Quantifizierung mehrere Knospen zusammengefasst werden. Ein ausgeprägter, makroskopisch sichtbarer Phänotyp konnte nicht beobachtet werden. Die im Experiment eingesetzten Knospen zeigten keine verringerte Überlebensrate. Auch eine Veränderung der Körperkontraktionen konnte nicht beobachtet werden. Im Falle von Aktin, das über 5 % der Proteinmenge in einer Zelle ausmacht (Kabsch & Vandekerckhove 2003), ist daher vermutlich eine deutlich länger RNAi-Behandlung der Zellen notwendig um nicht nur eine Veränderung der mRNA-Level, sondern auch der Proteinmengen zu erreichen. Die über den gesamten Zeitraum des Experimentes deutlich erniedrigten Aktin-mRNA-Level jedoch belegen eindeutig, dass die fütterungsinduzierte RNA-Interferenz in Schwämmen zu einem Gen-Knock-down führt. Damit bietet das etablierte Protokoll für Schwämme eine neue molekularbiologische Technik, die funktionelle genomische Untersuchungen ermöglicht.

Die vorliegenden Untersuchungen am Beispiel des Aktin-Gens konnten zwar die generelle Anwendbarkeit der RNA-Interferenz in Schwämmen zeigen und ein erstes Protokoll hierfür etablieren, jedoch bleibt ein kritischer Punkt unbeantwortet. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die eingeschleuste dsRNA alle Zellen des Schwammes oder nur einen Teil, der an der Nahrungsaufnahme beteiligt ist, erreicht hat. Nur Zellen, in die dsRNA eingeschleust werden konnte, weisen anschließend veränderte mRNA-Level auf. Für funktionelle Untersuchungen von genregulatorischen Netzwerken ist dies jedoch ein essenzieller Punkt. Dies könnte experimentell in weiteren Arbeiten geklärt werden, in dem Bakterien an die Schwämme verfüttert werden, die Morpholinos einer artifiziellen Sequenz, die nicht im Schwamm vorkommt, enthalten. Morpholinos sind aufgrund chemischer Modifikationen gegen den Abbau durch die Zellen geschützt und daher über einen langen Zeitraum in den Zellen, in die sie eingeschleust wurden, nachweisbar. Ein Nachweis der Morpholinos in Schwammzellen könnte durch *In Situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden

erfolgen. Auf diese Weise könnten diejenigen Schwammzellen identifiziert werden, die durch die Fütterung mit Bakterien dsRNA aufnehmen. Sollten nur einzelne Zelltypen wie Pinacozyten und Choanozyten erreicht werden, stellt dies kein Ausschlusskriterium für die Anwendbarkeit der fütterungsinduzierten RNA-Interferenz in Schwämmen dar, sondern lediglich eine Einschränkung bei der Auswahl der Zielgene und zu untersuchenden Prozesse.

### Schlussfolgerungen

Mit dem integrativen Ansatz zur Etablierung der fütterungsinduzierten RNA-Interferenz in Schwämmen, welcher detaillierte Untersuchungen zur Entwicklung von Knospen und den Aufbau des Wasserleitungssystems berücksichtigt, konnte neben einer neuen Technik für funktionelle genetische Untersuchungen in basalen Metazoen auch ein Beitrag zum besseren Verständnis der Schwammbiologie geliefert werden. Die detaillierten Untersuchungen der Knospenbildung zeigten zum ersten Mal, dass auch in der Entwicklung von Knospen eine distinkte sequenzielle Reihe von räumlich-zeitlichen Mustern zu beobachten ist. Damit scheint die Knospenentwicklung höher reguliert und koordiniert zu sein als bisher angenommen. Vermutlich sind dieselben Entwicklungsgene, die in der Larvenentwicklung räumlich-zeitliche Musterbildung koordinieren, auch in der Knospenentwicklung involviert. Abgelöste Knospen können im Fall von *T. wilhelma* auch als Jungschwämme bezeichnet werden und als voll differenzierte funktionelle Äquivalente adulter Individuen in morphologischen, physiologischen und genetischen Untersuchungen eingesetzt werden. Damit stellen Knospen auch ein interessantes und gut zugängliches Studienobjekt für funktionelle Untersuchungen von Entwicklungsgenen dar.

Die Analysen von Wasserleitungssystemabgüssen lieferten quantitative und qualitative Daten, die zum Verständnis der Architektur des Wasserleitungssystems von Schwämmen beitrugen. Dieses erwies sich als hoch effizientes Flüssigkeitstransportsystem, welches den zur Verfügung stehenden Raum durch das komplexe Kanalnetzwerk so ausfüllt, dass ein möglichst geringer Strömungswiderstand im System erreicht wird und gleichzeitig ein möglichst großer Bereich für die Nahrungsaufnahme und den Gasaustausch zur Verfügung steht. Die Analysen ergaben Hinweise auf die Funktion spezialisierter Kanalsystemabschnitte, wie der Bypasselemente, die die Regel eines unidirektionalen Wasserleitungssystems brechen. Dieser, daraus resultierenden, höheren Komplexität der Kanalsysteme liegen vermutlich verschiedene hier postulierte Ursachen zugrunde, die in Zukunft verifiziert werden sollten. Auf zellulärer Ebene konnte ein bisher nicht beschriebener Zelltyp näher charakterisiert werden, der eventuell in der Strömungsregulation eine Rolle spielt. Die in der Arbeit angefertigten 3D-Modelle und erhobenen quantitativen Daten von Wasserleitungssystemen eröffnen die Möglichkeit für weiterführende biophysikalische Untersuchungen, die anhand von Computer gestützten Fluidodynamik Modellen helfen können, die Funktion und den Einfluss von spezialisierten Abschnitten wie der Bypasselemente auf das Wasserleitungssystem zu modellieren und besser zu verstehen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abraham ER (2001) The fractal branching of an arborescent sponge. *Marine Biology* 138: 503-510
- Adamska M, Degnan SM, Green KM, Adamski M, Craigie A, Larroux C, Degnan BM (2007) Wnt and TGF-beta expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning. *PLoS ONE* 2: e1031
- Ax P (1995) Das System der Metazoa I. Gustav Fischer, Jena Stuttgart New York
- Ayling AL (1980) Patterns of sexuality, asexual reproduction and recruitment in some subtidal marine Demospongiae. *Biological Bulletin* 158: 271-282
- Ayling AL (1983) Growth and regeneration rates in thinly encrusting Demospongiae from temperate waters. *Biological Bulletin* 165: 343-352
- Bavestrello G, Arillo A, Calcinai B, Cerrano C (2003) The aquiferous system of *Scolymastra joubini* (Porifera, Hexactinellida) studied by corrosion casts. *Zoomorphology* 122: 119-123
- Bavestrello G, Burlando B, Sarà M (1988) The architecture of the canal systems of *Petrosia ficiformis* and *Chondrosia reniformis* studied by corrosion casts (Porifera, Demospongiae). *Zoomorphology* 108: 161-166
- Bavestrello G, Burlando B, Sarà M (1995) Corrosion cast reconstruction of the three-dimensional architecture of demosponge canal system. In: Lanzavecchia G, Valvassori R, Candia Carnevali MD (Hrsg.) Body cavities: function and phylogeny: Selected Symposia and Monographs U.Z.I., 8. Mucchi, Modena, S. 93-110
- Bavestrello G, Calcinai B, Boyer M, Cerrano C, Pansini M (2002) The aquiferous system of two *Oceanapia* species (Porifera, Demospongiae) studied by corrosion casts. *Zoomorphology* 121: 195-202
- Bavestrello G, Cerrano C, Corriero G, Sarà M (1998) Three-Dimensional Architecture of the Canal System of Some Hadromerids (Porifera, Demospongiae). In: Watanabe Y, Fusetani N (Hrsg.) Sponge Sciences. Multidisciplinary Perspectives. Springer, Tokyo, S. 235-247
- Beckmann F, Donath T, Dose T, Lippmann T, Martins RV, Metge J, Schreyer A (2004) Microtomography using synchrotron radiation at DESY: current status and future developments. *Proceedings of SPIE* 5535: 1-10
- Beckmann F, Herzen J, Haibel A, Müller B, Schreyer A (2008) High density resolution in synchrotron-radiation-based attenuation-contrast microtomography. *Proceedings of SPIE* 7078: 70781D
- Bergquist PR (1978) Sponges. University of California Press, Los Angeles
- Bialonski S, Horstmann M-T, Lehnertz K (2010) From brain to earth and climate systems: Small-world interaction networks or not? *Chaos* 20: 013134
- Blum H (1973) Biological Shape and Visual Science .1. *Journal of Theoretical Biology* 38: 205-287
- Boccaletti S, Latora V, Moreno Y, Chavez M, Hwang DU (2006) Complex networks: Structure and dynamics. *Physics Reports* 424: 175-308
- Bond C, Harris AK (1988) Locomotion of Sponges and Its Physical Mechanism. *Journal of Experimental Biology* 246: 271-284
- Bond C, Harris AK (1992) Continuous cell movements rearrange anatomical structures in intact sponges. *Journal of Experimental Zoology* 263: 284-302
- Borchiellini C, Manuel M, Alivon E, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y (2001) Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 171-179
- Born M, Wolf E (1999) Principles of optics. Cambridge University Press, Cambridge
- Boskamp T, Hahn HK, Hindennach M, Zidowitz S, Peitgen H-O, Oeltze S, Preim B (2005) Geometrical and Structural Analysis of Vessel Systems in 3D Medical Image Datasets. In: Leondes CT (Hrsg.) Medical Imaging Systems Technology Vol. V. World Scientific, New Jersey, S. 1-60

- Botha CP, Post FH (2008) Hybrid scheduling in the DeVIDE dataflow visualisation environment. Paper presented at Simulation and Visualization
- Boury-Esnault N (1970) Un phénomène de bourgeonnement externe chez l'éponge *Axinella damicornis* (Esper). *Cahiers de Biologie Marine* 11: 491-496
- Boury-Esnault N (1973) L'exopinacoderme des spongiaires. *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris* 178: 1193-1206
- Boury-Esnault N (2006) Systematics and evolution of Demospongiae. *Canadian Journal of Zoology* 84: 205-224
- Boury-Esnault N, De Vos C, Donadey C, Vacelet J (1984) Comparative study of the choanosome of Porifera: I The Homoscleromorpha. *Journal of Morphology* 180: 3-17
- Boury-Esnault N, De Vos C, Donadey C, Vacelet J (1990) Ultrastructure of choanosome and sponge classification. Paper presented at 3rd International Sponge Conference - New perspectives in sponge biology. Woods Hole, MA
- Brasier M, Green O, Shields G (1997) Ediacarian sponge spicule clusters from southwestern Mongolia and the origins of the Cambrian fauna. *Geology* 25: 303-306
- Bullmore E, Sporns O (2009) Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 186-198
- Burlando B, Bavestrello G, Sarà M, Cocito S (1990) The aquiferous systems of *Spongia officinalis* and *Cliona viridis* (Porifera) based on corrosion cast analysis. *Bollettino Di Zoologia* 57: 233-240
- Campbell RD (1974) Cnidaria. In: Giese AC, Pearse JS (Hrsg.) Reproduction of marine invertebrates. Vol I. Acoelomate and Pseudocoelomate Metazoans. Academic Press, New York, S. 133-200
- Canny MJ (1993) The Transpiration Stream in the Leaf Apoplast: Water and Solutes. *Philosophical Transactions of the Royal Society London: B* 341: 87-100
- Cerda GA, Thomas JE, Allende ML, Karlstrom RO, Palma V (2006) Electroporation of DNA, RNA, and morpholinos into zebrafish embryos. *Methods* 39: 207-211
- Chapman JA, Kirkness EF, Simakov O, Hampson SE, Mitros T, Weinmaier T, Rattei T, et al. (2010) The dynamic genome of *Hydra*. *Nature* 464: 592-596
- Clarkson SG, Wolpert L (1967) Bud morphogenesis in *Hydra*. *Nature* 214: 780-783
- Connes R (1967) Structure et développement des bourgeons chez l'éponge siliceuse *Tethya lyncurium* Lamarck. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale* 108: 157-195
- Connes R (1968) Etude histologique, cytologique et expérimentale de la régénération et de la reproduction asexuée chez *Tethya lyncurium* Lamarck (= *T. aurantium* Pallas) (Demosponges). Univ. Montpellier, Montpellier
- Corriero G, Sarà M, Vaccaro P (1996) Sexual and asexual reproduction in two species of *Tethya* (Porifera: Demospongiae) from a Mediterranean coastal lagoon. *Marine Biology* 126: 175-181
- Corriero G, Scalera Liaci L (1998) Reproductive strategies of *Mycale contarenii* (Porifera: Demospongiae). *Marine Biology* 131: 319-327
- Dagert M, Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23-38
- Davies PF (1989) How Do Vascular Endothelial Cells Respond to Flow? *News in Physiological Sciences* 4: 22-25
- De Vos C (1965) Le bourgeonnement externe de l'éponge *Mycale contarenii* (Martens) (Demosponges). *Bulletin du Musée d'Histoire Naturelle de Paris* 37: 548-555
- De Vos C, Boury-Esnault N (1990) The apopylar cell of sponges. Paper presented at 3rd International Sponge Conference - New perspectives in sponge biology. Woods Hole, MA
- Dirnhofer S, Berger C, Untergasser G, Geley S, Berger P (1995) Human [beta]-actin retroviral pseudogenes interfere with RT-PCR. *Trends in Genetics* 11: 380-381
- Donath T (2007) Quantitative X-ray Microtomography with Synchrotron Radiation. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg

- Dunn CW, Hejnal A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sorensen MV, Haddock SH, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G (2008) Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452: 745-749
- Dunn SR, Phillips WS, Green DR, Weis VM (2007) Knockdown of Actin and Caspase Gene Expression by RNA Interference in the Symbiotic Anemone *Aiptasia pallida*. *Biological Bulletin* 212: 250-258
- Ellwanger K, Eich A, Nickel M (2007) GABA and glutamate specifically induce contractions in the sponge *Tethya wilhelma*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 193: 1-11
- Ellwanger K, Nickel M (2006) Neuroactive substances specifically modulate rhythmic body contractions in the nerveless metazoon *Tethya wilhelma* (Demospongiae, Porifera). *Front Zool* 3: 7
- Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M (1988) Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Journal of Biological Chemistry* 263: 15335-15341
- Ereskovsky A, Tokina D (2007) Asexual reproduction in homoscleromorph sponges (Porifera; Homoscleromorpha). *Marine Biology* 151: 425-434
- Ereskovsky AV (2003) The problem of colonial, modular and individual nature of sponges and special features of their morphogenesis during growth and asexual reproduction. *Russian Journal of Marine Biology* 29: 46-56
- Ereskovsky AV (2010) The comparative embryology of sponges. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York
- Ereskovsky AV, Borchellini C, Gazave E, Ivanisevic J, Lapébie P, Perez T, Renard E, Vacelet J (2009) The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology. *BioEssays* 31: 89-97
- Erwin DH (2009) Early origin of the bilaterian developmental toolkit. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 2253-2261
- Fell PE (1993) Porifera. In: Adivodi KG, Adivodi RG (Hrsg.) Reproductive biology of invertebrates: Asexual propagation and reproductive strategies. Vol 6. John Wiley & Sons, Chichester; New York, S. 1-44
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811
- Fischer AB, Hofmann DK (2004) Budding, bud morphogenesis, and regeneration in *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cnidaria: Cubozoa). *Hydrobiologia* 530/531: 331-337
- Funayama N, Nakatsukasa M, Hayashi T, Kiyokazu A (2005) Isolation of the choanocyte in the fresh water sponge, *Ephydatia fluviatilis* and its lineage marker, *Ef annexin*. *Development, Growth & Differentiation* 47: 243-253
- Funayama N, Nakatsukasa M, Mohri K, Masuda Y, Agata K (2010) *Piwi* expression in archeocytes and choanocytes in demosponges: insights into the stem cell system in demosponges. *Evolution & Development* 12: 275-287
- Gaino E, Mercurio M, Sciscioli M, Corriero G (2009) Choanocyte chambers in unreleased buds of *Tethya seychellensis* (Wright, 1881) (Porifera, Demospongiae). *Italian Journal of Zoology* 76: 64-69
- Gaino E, Scalera Liaci L, Sciscioli M, Corriero G (2006) Investigation of the budding process in *Tethya citrina* and *Tethya aurantium* (Porifera, Demospongiae). *Zoomorphology* 125: 87-97
- Hagberg AA, Schult DA, Swart PJ (2008) Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX. Paper presented at Proceedings of the 7th Python in Science Conference (SciPy2008). Pasadena, CA USA
- Hammel J, Herzen J, Beckmann F, Nickel M (2009) Sponge budding is a spatiotemporal morphological patterning process: Insights from synchrotron radiation-based x-ray microtomography into the asexual reproduction of *Tethya wilhelma*. *Frontiers in Zoology* 6: 19

- Harrison FW (1972) Phase Contrast Photo Micrography of Cellular Behavior in Spongillid Porocytes Porifera Spongillidae. *Hydrobiologia* 40: 513-517
- Harrison FW, Kaye NW, Kaye GW (1990) The Dermal Membrane of *Eunapius fragilis*. Paper presented at 3rd International Sponge Conference - New perspectives in sponge biology. Woods Hole, MA
- Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, von Laue CC, Snyder P, Rothbacher U, Holstein TW (2000) WNT signaling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407: 186-189
- Hoffmann F, Larsen O, Rapp HT, Osinga R (2005a) Oxygen dynamics in choanosomal sponge explants. *Marine Biology Research* 1: 160-163
- Hoffmann F, Larsen O, Thiel V, Rapp H, Pape T, Michaelis W, Reitner J (2005b) An Anaerobic World in Sponges. *Geomicrobiology Journal* 22: 1-10
- Hörschemeyer T, Beutel RG, Pasop F (2002) Head structures of *Priacma serrata* Leconte (Coleoptera, Archostemata) inferred from X-ray tomography. *Journal of Morphology* 252: 298-314
- Horton RE (1945) Erosional development of streams and their drainage basins; Hydrophysical approach to quantitative morphology. *Geological Society of America Bulletin* 56: 275-370
- Hudziak RM, Barofsky E, Barofsky DF, Weller DL, Huang S-B, Weller DD (1996) Resistance of Morpholino Phosphorodiamidate Oligomers to Enzymatic Degradation. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 6: 267-272
- Huesman R, Gullberg G, Greenberg W, TF B (1977) RECLBL Library users manual: Donner algorithms for reconstruction tomography. Lawrence Berkeley Laboratory, University of California, Livermore
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- Jakob W, Sagasser S, Dellaporta S, Holland P, Kuhn K, Schierwater B (2004) The *Trox-2 Hox/ParaHox* gene of *Trichoplax* (Placozoa) marks an epithelial boundary. *Development Genes and Evolution* 214: 170-175
- Jakob W, Schierwater B (2007) Changing Hydrozoan Bauplans by Silencing *Hox*-Like Genes. *PLoS ONE* 2: e694
- Jones WC (1962) Is there a nervous system in sponges? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 37: 1-50
- Kabsch W, Vandekerckhove J (2003) Structure and Function of Actin. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 21: 49-76
- Kilian EF (1993) Band 1: Wirbellose Tiere, 1. Teil: Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera. Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Gustav Fischer, Jena Stuttgart New York
- Kim DH, Rossi JJ (2007) Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8: 173-184
- King N, Westbrook MJ, Young SL, Kuo A, Abedin M, Chapman J, Fairclough S, et al. (2008) The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* 451: 783-788
- Knoll A (2004) Life on a Young Planet: The First Three Billion Years of Evolution on Earth. Princeton University Press
- Krucker T, Lang A, Meyer EP (2006) New polyurethane-based material for vascular corrosion casting with improved physical and imaging characteristics. *Microscopy Research and Technique* 69: 138-147
- Kruszyński K, Kaandorp J, van Lier R (2007) A computational method for quantifying morphological variation in scleractinian corals. *Coral Reefs* 26: 831-840
- Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW (2005) Unexpected complexity of the *Wnt* gene family in a sea anemone. *Nature* 433: 156-160
- LaBarbera M (1990) Principles of Design of Fluid Transport Systems in Zoology. *Science* 249: 992-1000
- Langenbruch P-F (1985) Die Aufnahme partikulärer Nahrung bei *Reniera* sp. (Porifera). *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 39: 263-272

- Langenbruch PF (1988) Body Structure of Marine Sponges: V. Structure of Choanocyte Chambers in Some Mediterranean and Caribbean Haplosclerid Sponges Porifera. *Zoomorphology* 108: 13-22
- Langenbruch PF, Jones WC (1990) Body structure of marine sponges: VI. Choanocyte chamber structure in the Haplosclerida (Porifera, Demospongiae) and its relevance to the phylogenesis of the group. *Journal of Morphology* 204: 1-8
- Langenbruch PF, Scalera Liaci L (1990) Structure of choanocyte chambers in Haplosclerid sponges. Paper presented at 3rd International Sponge Conference - New perspectives in sponge biology. Woods Hole, MA
- Langenbruch PF, Simpson TL, Scalera Liaci L (1985) Body structure of marine sponges: III The structure of choanocyte chambers in *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *Zoomorphology* 105: 383-387
- Lapébie P, Gazave E, Ereskovsky A, Derelle R, Bézac C, Renard E, Houliston E, Borchellini C (2009) WNT/ $\beta$ -Catenin Signalling and Epithelial Patterning in the Homoscleromorph Sponge *Oscarella*. *PLoS ONE* 4: e5823
- Larroux C, Fahey B, Liubicich D, Hinman VF, Gauthier M, Gongora M, Green K, Wörheide G, Leys SP, Degnan BM (2006) Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evolution & Development* 8: 150-173
- Larsen PS, Riisgard HU (1994) The sponge pump. *Journal of Theoretical Biology* 168: 53-63
- Lee PN, Pang K, Matus DQ, Martindale MQ (2006) A WNT of things to come: Evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17: 157-167
- Leys SP, Eerkes-Medrano DI (2006) Feeding in a calcareous sponge: particle uptake by pseudopodia. *Biological Bulletin* 211: 157-171
- Li C-W, Chen J-Y, Hua T-E (1998) Precambrian Sponges with Cellular Structures. *Science* 279: 879-882
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402-408
- Maas O (1901) Die Knospenentwicklung der *Tethya* und ihr Vergleich mit der geschlechtlichen Fortpflanzung der Schwämme. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 70: 263-288
- Maldonado M (2004) Choanoflagellates, choanocytes, and animal multicellularity. *Invertebrate Biology* 123: 1-22
- Maldonado M (2006) The ecology of the sponge larva. *Canadian Journal of Zoology* 84: 175-194
- Mandelbrot B (1983) The fractal geometry of Nature. Freeman & Co., New York
- Manuel M (2009) Early evolution of symmetry and polarity in metazoan body plans. *Comptes Rendus Biologies* 332: 184-209
- Marcinek D, Labarbera M (1994) Quantitative Branching Geometry of the Vascular System of the Blue Crab, *Callinectes sapidus* (Arthropoda, Crustacea): A Test of Murray's Law in an Open Circulatory System. *The Biological Bulletin* 186: 124-133
- Marshall W (1885) Coelenterata, Porifera, Tetractinellidae; Tafel XLVII. In: Leukart R (Hrg.) Zoologische Wandtatafeln der wirbellosen Thiere. Th. Fischer, Kassel
- Martindale MQ (2005) The evolution of metazoan axial properties. *Nature Reviews Genetics* 6: 917-927
- Momose T, Derelle R, Houliston E (2008) A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Development* 135: 2105-2113
- Momose T, Houliston E (2007) Two Oppositely Localised Frizzled RNAs as Axis Determinants in a Cnidarian Embryo. *PLoS Biology* 5: e70
- Murray CD (1926) The physiological principle of minimum work. I. The vascular system and the cost of flood volume. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 12: 207-214
- Nickel M (2004) Kinetics and rhythm of body contractions in the sponge *Tethya wilhelma* (Porifera: Demospongiae). *Journal of Experimental Biology* 207: 4515-4524



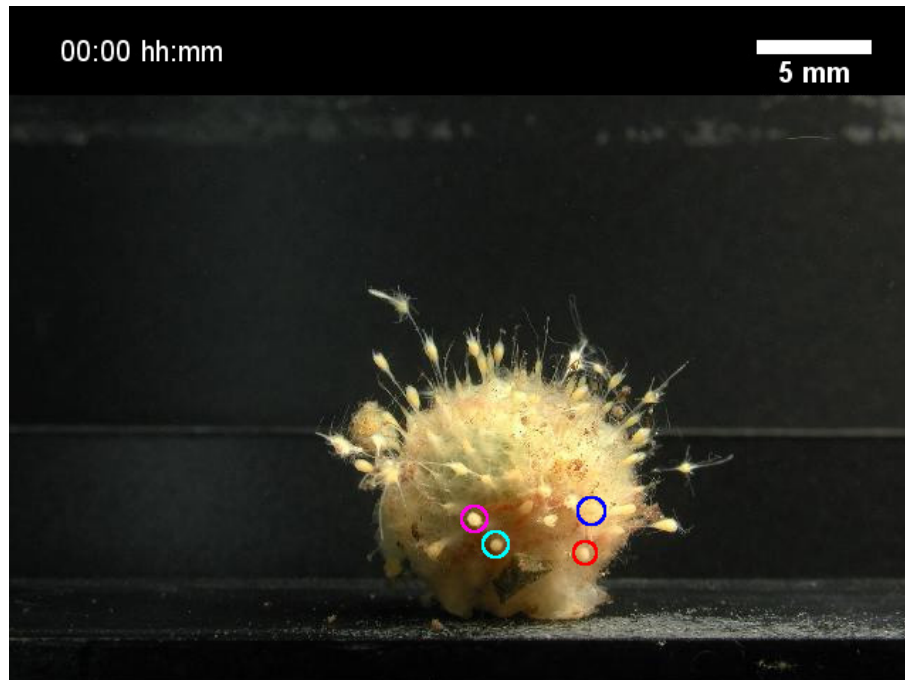
- Nickel M, Brümmer F (2004) Body extension types of *Tethya wilhelma*: cellular organisation and their function in movement. *Bollettino dei musei e degli istituti biologici dell' Università di Genova* 68: 483-489
- Nickel M, Bullinger E, Beckmann F (2006a) Functional morphology of *Tethya* species (Porifera): 2. Three-dimensional morphometrics on spicules and skeleton superstructures of *T. minuta*. *Zoomorphology* 125: 225-239
- Nickel M, Donath T, Schweikert M, Beckmann F (2006b) Functional morphology of *Tethya* species (Porifera): 1. Quantitative 3D-analysis of *Tethya wilhelma* by synchrotron radiation based X-ray microtomography. *Zoomorphology* 125: 209-223
- Nickel M, Hammel J, Herzen J, Bullinger E, Beckmann F (2008) High density resolution synchrotron radiation based x-ray microtomography (SR  $\mu$ CT) for quantitative 3D-morphometrics in zoological sciences. *Proceedings of SPIE* 7078: 7078W
- Pavans de Cecatty M (1966) Ultrastructures et rapports des cellules mésenchymateuses de type nerveux de l'éponge *Tethya lynchurium* (Lamark). *Annales des Sciences naturelles, Biologie Animale* 8: 577-614
- Pérez-Escudero A, Rivera-Alba M, de Polavieja GG (2009) Structure of deviations from optimality in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 20544-20549
- Pfaffl MW (2006) Relative quantification. In: Dorak MT (Hrg.) Real-time PCR. Taylor & Francis, London and New York, S. 63-83
- Philippe H, Derelle R, Lopez P, Pick K, Borchellini C, Boury-Esnault N, Vacelet J, Renard E, Houlston E, Quéinnec E, Da Silva C, Wincker P, Le Guyader H, Leys S, Jackson DJ, Schreiber F, Erpenbeck D, Morgenstern B, Wörheide G, Manuel M (2009) Phylogenomics Revives Traditional Views on Deep Animal Relationships. *Current Biology* 19: 706-712
- Pianka HD (1974) Ctenophora. In: Giese AC, Pearse JS (Hrgg.) Reproduction of marine invertebrates. Vol Volume I. Acoelomate and Pseudocoelomate Metazoans. Academic Press, New York, S. 201-266
- Pick KS, Philippe H, Schreiber F, Erpenbeck D, Jackson DJ, Wrede P, Wiens M, Alie A, Morgenstern B, Manuel M, Wörheide G (2010) Improved phylogenomic taxon sampling noticeably affects non-bilaterian relationships. *Molecular Biology and Evolution*: msq089
- Preston NP, Baule VJ, Leopold R, Henderling J, Atkinson PW, Whyard S (2000) Delivery of DNA to early embryos of the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 181: 225-234
- Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, Dirks B, Chapman J, Salamov A, Terry A, Shapiro H, Lindquist E, Kapitonov VV, Jurka J, Genikhovich G, Grigoriev IV, Lucas SM, Steele RE, Finnerty JR, Technau U, Martindale MQ, Rokhsar DS (2007) Sea Anemone Genome Reveals Ancestral Eumetazoan Gene Repertoire and Genomic Organization. *Science* 317: 86-94
- Rasband WS (1997-2010) ImageJ, Bethesda, Maryland, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Reiswig HM (1971) In situ pumping activities of tropical Demospongiae. *Marine Biology* 9: 38-50
- Reiswig HM (1973) Population Dynamics of Three Jamaican Demospongiae. *Bulletin of Marine Science* 23: 191-226
- Reiswig HM (1975) The aquiferous systems of three marine demospongiae. *Journal of Morphology* 145: 493-502
- Reitner J, Wörheide G (2002) Non-Lithistid Fossil Demospongiae – Origins of their Palaeobiodiversity and Highlights in History of Preservation. In: Hooper JNA, Van Soest RWM (Hrgg.) Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges. Vol 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, New York, S. 52-68
- Rentzsch F, Fritzenwanker JH, Scholz CB, Technau U (2008) FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Development* 135: 1761-1769

- Riisgard HU, Larsen PS (2001) Minireview: Ciliary Filter Feeding and Bio-Fluid Mechanics -- Present Understanding and Unsolved Problems. *Limnology and Oceanography* 46: 882-891
- Ryan J, Baxevasis A (2007) *Hox*, *Wnt*, and the evolution of the primary body axis: insights from the early-divergent phyla. *Biology Direct* 2: 37
- Saina M, Genikhovich G, Renfer E, Technau U (2009) BMPs and Chordin regulate patterning of the directive axis in a sea anemone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 18592-18597
- Saller U (1990) Formation and construction of asexual buds of the freshwater sponge *Radiospongia cerebellata* (Porifera, Spongillidae). *Zoomorphology* 109: 295-301
- Sarà M (1994) A new species of *Tethya*, *T. Tenuisclera* (Porifera, Demospongiae) from the Maldives. *Bollettino dei musei e degli istituti biologici dell' Università di Genova* 58-59: 69-75
- Sarà M, Corriero G, Bavestrello G (1993) *Tethya peracuta* (Topsent) and *T. comorensis* n. sp. (Porifera, Demospongiae) from the coral reef of Mayotte (Comores). *Bollettino Di Zoologia* 60: 219-224
- Sarà M, Sarà A, Nickel M, Brümmer F (2001) Three new species of *Tethya* (Porifera: Demospongiae) from German aquaria. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Serie A* 631: 1-15
- Schmidt-Rhaesa A (2007) The evolution of organ systems. Oxford University Press, Oxford
- Schubert M, Holland ND, Laudet V, Holland LZ (2006) A retinoic acid-*Hox* hierarchy controls both anterior/posterior patterning and neuronal specification in the developing central nervous system of the cephalochordate amphioxus. *Developmental Biology* 296: 190-202
- Schulze FE (1891) Über *Trichoplax adhaerens*. *Abhandlungen der königlich preussischen Akademie der Wissenschaften*: 1-23
- Selenka E (1879) Ueber einen Kieselschwamm von achtstrahligen Bau und über Entwicklung der Schwammknospen. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 3: 467-476
- Shimeld SM, Degnan B, Luke GN Evolutionary genomics of the Fox genes: Origin of gene families and the ancestry of gene clusters. *Genomics* 95: 256-260
- Simpson TL (1968) The Structure and function of Sponge. *Bulletin, Peabody Museum of Natural History* 25: 1-141
- Simpson TL (1984) The cell biology of sponges. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Smith M, Shneiderman B, Milic-Frayling N, Rodrigues EM, Barash V, Dunne C, Capone T, Perer A, Gleave E (2009) Analyzing (Social Media) Networks with NodeXL. Paper presented at C&T '09: Proceedings of the Fourth International Conference on Communities and Technologies
- Sollas WJ (1888) Report on the Tetractinellida collected by H.M.S. Challenger, during the years 1873-1876. In: Report on the scientific results of the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873-76, Eds. Wyville Thomson C, Murray J. Report on the scientific results of the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873-76. Vol XXV. Published on the order of her Majesty's government
- Srivastava M, Begovic E, Chapman J, Putnam NH, Hellsten U, Kawashima T, Kuo A, Mitros T, Salamov A, Carpenter ML, Signorovitch AY, Moreno MA, Kamm K, Grimwood J, Schmutz J, Shapiro H, Grigoriev IV, Buss LW, Schierwater B, Dellaporta SL, Rokhsar DS (2008) The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature* 454: 955-960
- Srivastava M, Larroux C, Lu D, Mohanty K, Chapman J, Degnan B, Rokhsar D (2010) Early evolution of the *LIM* homeobox gene family. *BMC Biology* 8: 4
- Starck D, Siewing R (1980) Concerning the Discussion of the Terms Mesenchym and Mesoderm. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere* 103: 374-388
- Summerton J, D.D. W (1993) Uncharged Morpholino-based polymers having phosphorour linked chiral intersubunit linkages. In: Patent US (Hrg.). Vol. 5,185,444

- Summerton J, Weller D (1997) Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 7: 187-195
- Tabara H, Grishok A, C. Mello C (1998) Reverse Genetics: RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome Sequence. *Science* 282: 430-431
- Tardent P (1978) Keimblätterentwicklung und Verwirklichung der Grundgestalt. In: Seidel F (Hrg.) *Morphogenese der Tiere*. Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 208-222
- Thurner P, Müller B, Beckmann F, Weitkamp T, Rau C, Müller R, Hubbell JA, Sennhauser U (2003) Tomography studies of human foreskin fibroblasts on polymer yarns. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 200: 397-405
- Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103-112
- Timmons L, Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854-854
- Vacelet J, Boury-Esnault N, De Vos C, Donadey C (1989) Comparative study of the choanosome of Porifera: II The Keratose sponges. *Journal of Morphology* 201: 119-129
- Vogel S (1983) *Life in moving fluids. The physical biology of flow*. Princeton University Press, Princeton
- Weibel ER, Gomez DM (1962) Architecture of the Human Lung: Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Science* 137: 577-585
- Weissenfels N (1976) Structure and Function of the Fresh Water Sponge *Ephydatia-fluviatilis* Porifera: 3. Capture of Food Digestion and Defecation. *Zoomorphologie* 85: 73-88
- Weissenfels N (1980) Structure and Function of the Fresh Water Sponge *Ephydatia fluviatilis* Porifera: 7. The Porocytes. *Zoomorphologie* 95: 27-40
- Weissenfels N (1981) Structure and Function of the Fresh Water Sponge *Ephydatia fluviatilis* Porifera: 8. The Origin and Development of the Flagellated Chambers and Their Junction with the Excurrent Canal System. *Zoomorphology* 98: 35-46
- Weissenfels N (1982a) Scanning electron microscope histology of spongy *Ephydatia fluviatilis* material. *Microscopica Acta* 85: 345-350
- Weissenfels N (1982b) Structure and Function of the Fresh Water Sponge *Ephydatia fluviatilis* Porifera: 9. Scanning Electron Microscope Histology and Cytology. *Zoomorphology* 100: 75-88
- Weissenfels N (1983) Structure and Function of the Fresh Water Sponge *Ephydatia fluviatilis* Porifera: 10. The Demonstration of the Open Mesenchyme by Feeding Yeast Cells *Saccharomyces cerevisiae*. *Zoomorphology* 103: 15-24
- Weissenfels N (1989) *Biologie und Mikroskopische Anatomie der Süßwasserschwämme (Spongillidae)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Willenz P, Hartman WD (1989) Micromorphology and ultrastructure of Caribbean sclerosponges. *Marine Biology* 103: 387-401
- Wilson HV (1907) On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *Journal of Experimental Zoology* 5: 245-258
- Xie W, Thompson RP, Perucchio R (2003) A topology-preserving parallel 3D thinning algorithm for extracting the curve skeleton. *Pattern Recognition* 36: 1529-1544
- Yamada A, Martindale MQ, Fukui A, Tochinai S (2010) Highly conserved functions of the Brachyury gene on morphogenetic movements: Insight from the early-diverging phylum Ctenophora. *Developmental Biology* 339: 212-222
- Zamir M (1976) Optimality principles in arterial branching. *Journal of Theoretical Biology* 62: 227-251

## 7 Anhang

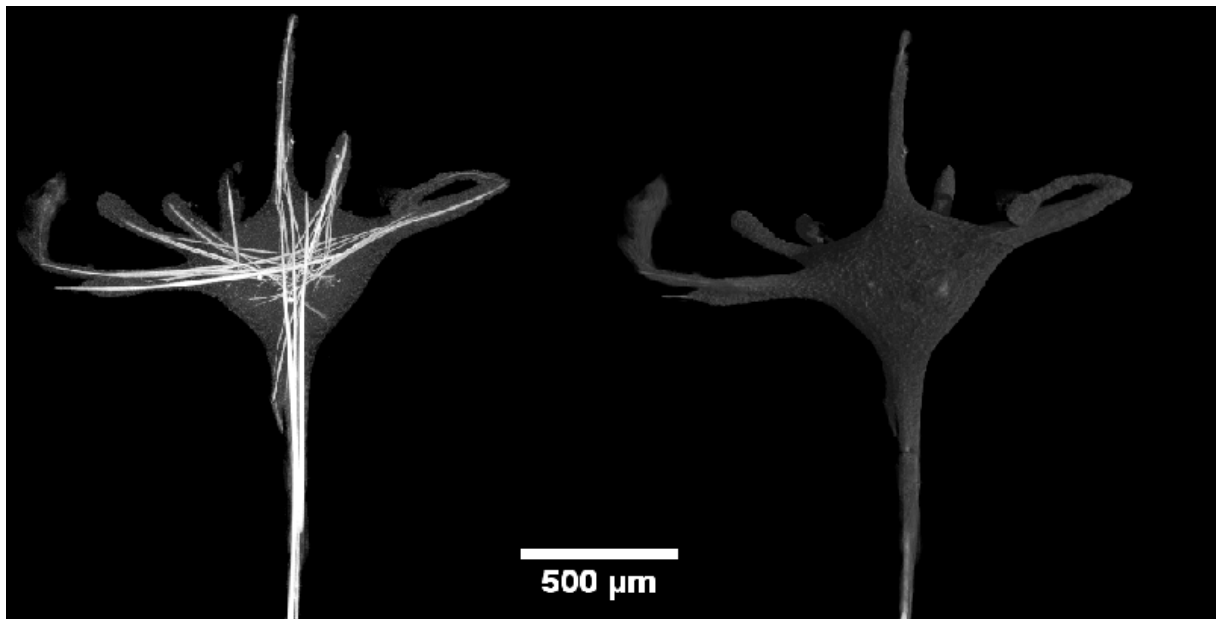
### Anhang 1: Filme (Quicktime-Format auf CD)



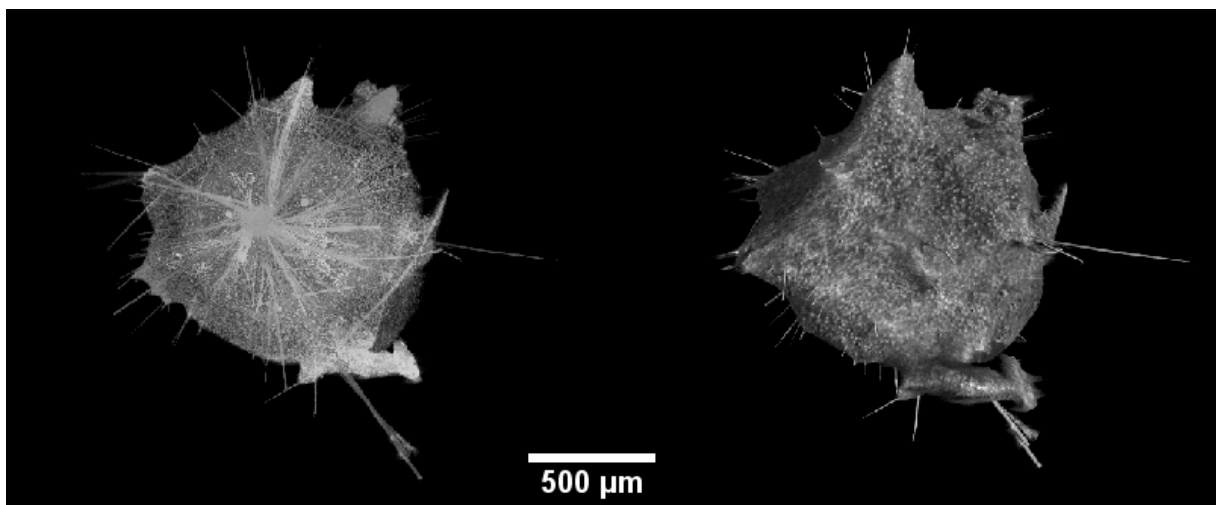
**Film 1:** Knospenbildung in *T. wilhelma*. Zeitrafferaufnahmen (9000 x schneller) der Knospenbildung an einem adulten Individuum von *T. wilhelma*. Details siehe Abschnitt 4.1.1 und Abbildung 18.



**Film 2:** Knospenbildung in *T. wilhelma*. Zeitrafferaufnahmen (1800 x schneller) der Knospenbildung an einem adulten Individuum von *T. wilhelma*. Details siehe Abschnitt 4.1.1 und Abbildung 18.



**Film 3:** 3D-Morphologie einer Stadium 1-Knospe. Film (AVI-Format auf CD): 360° Rotation einer Projektion (links) und eines Volumenrenderings (rechts) von Mikrotomografischen Daten. Details siehe Text und Abbildung 25.



**Film 4:** 3D-Morphologie einer Stadium 4-Knospe. Film (AVI-Format auf CD): 360° Rotation einer Projektion (links) und eines Volumenrenderings (rechts) von Mikrotomografischen Daten. Details siehe Text und Abbildung 25.

## Anhang 2: ImageJ Makros (txt-Format auf CD)

Makro 1: Skalierung von SR-µCT Rohdaten	(01_Makro.txt)
Makro 2: Maskengenerierung	(02_Makro.txt)
Makro 3: Hintergrundsubtraktion	(03_Makro.txt)
Makro 4: Stapelverarbeitung CLAHE-Filter	(04_Makro.txt)

### Anhang 3: Publikationen (PDF-Format auf CD)

- Hammel, J.U., (2010): "Zur Funktion des Wasserleitungssystems und der Entwicklung von Knospen in Schwämmen. Morphologische Grundlagen einer reversen Genetik. Dissertation
- Hammel, J.U., Herzen, J., Beckmann, F. and Nickel, M., (2009): "Sponge budding is a spatiotemporal morphological patterning process: Insights from synchrotron radiation-based x-ray microtomography into the asexual reproduction of *Tethya wilhelma*". Frontiers in Zoology 6(1): 19
- Nickel, M., Hammel, J. U., Herzen, J., Bullinger, E. and Beckmann, F., (2008): "High density resolution synchrotron radiation based x-ray microtomography (SR- $\mu$ CT) for quantitative 3D-morphometrics in zoological sciences", Proceedings of SPIE, 7078: 7078W

## Anhang 4: Verzeichnis der Abkürzungen<sup>10</sup>

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
‰	Promille
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
bp	Basenpaare
C <sub>t</sub>	Threshold-Cycle-Number
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cDNA	complementary DNA
CFD-Modelle	Computational-Fluid-Dynamics-Modelle
cm	Zentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
ddH <sub>2</sub> O	zweifach Deionisiertes Wasser
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DIC-Mikroskopie	Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie
dsRNA	Doppelstrang RNA
EST	Expressed-Sequence-Tag
GAPDH	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
keV	Kiloelektronenvolt
l	Liter
LED	lichtemittierende Diode
M	Molar
max	Maximum
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

<sup>10</sup> Abkürzungen in Abbildungen sind in den jeweiligen Bildunterschriften aufgeführt



mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaOCl	Natriumhypochlorit
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
rDNA	ribosomale DNA
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
sec	Sekunde
Sf	Skalierungsfaktor
siRNA	Small interfering RNA
SR-μCT	Auf Synchrotronstrahlung basierende μCT
TALDO	Transaldolase
UpM	Umdrehungen pro Minute
v	Volumen
w	weight (Gewicht)
Δ	Mandelbrot Parameter
λ	Lichtwellenlänge
μCT	Mikro-Computertomografie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm <sup>3</sup>	Kubikmikrometer
π	Kreiszahl Pi (π≈3,1415)